التكنولوجيا الحيوية والجزيئية
فى
مجابهة الآفات الزراعية
والاجهــادت البيئـية

إعــداد

أ.د. زيدان هندي عبد الحميد

أستاذ كيمياء المبيدات والسموم

جامعة عين شمس -كلية الزراعة

الناشــــر

كانـزا جروب

التكنولوجيا الحيوية والجزيئية
فى مجابهة الآفات الزراعية
والاتجاهات البيئية

إعداد

أ.د / زيدان هندي عبدالحميد

أستاذ كيمياء المبيدات والسموم

كلية الزراعة - جامعة عين شمس

الناشر

كانزا جروب

٢٠٠٣

التكنولوجيا الحيوية والجزيئية
في مجابهة الآفات الزراعية
والإجهادات البيئية

*الطبعة الثانية ٢٠٠٣ :(مزودة ومنقحة)

كانـزا جروب للنشر والتوزيع

٢ عمارات أعضاء هيئة التدريس بجامعة عين شمس

الدمرداش ــ القاهرة ــ جمهورية مصر العربية

تليفون وفاكس: ٤٨٣٥٥٤٣ ــ ٤٨٥٤٧١١ (٢٠٢)

رقم الإيـــداع

٢٠٠١/١٧٧٠٦

إهـــــــداء

إلى والدي ووالدتي رحمة الله عليهما......

إلى زوجتي العزيزة ...د. نجوي محمود محمد حسين.... رئيس بحوث بمعهد بحوث وقاية النبات ...مركز البحوث الزراعية .... وزارة الزراعة.... من شاركتني مر الحياة وحلوها... وكانت لي عونا كبيرا ولأسرتي خير راعيا ... جزاها الله خيرا ... مع دعاء أن يحفظها الله و يراعاها.

إلى أبنائي الأعزاء: عمرو زيدان ... ايمن زيدان.... خالد زيدان... وفقهم الله... فقد كانوا عونا وسندا لنا كل الوقت.

إلى زملائي وأساتذتي بكلية الزراعة - جامعة عين شمس - والجامعات والمعاهد البحثية الأخرى لما قدموه لي من عون صادق.

إلى أحفادي....

سلمي ايمن زياد عمرو

بسم الله الرحمن الرحيم

مقدمة الكتاب :

كما هى العادة دائما بعد أن قررت من انهاء الكتابة فى موضوع ترشيد المبيدات وتعظيم دور وسائل واسلوب اتجاه الادارة المتكاملة للسيطرة على الآفات وكذلك تعميم نظام الزراعة المتواصلة والتركيز على الاداء المناسب للعمليات الزراعية ونشر كل أساليب استكشاف تواجد الآفات حتى يمكن التنبؤ بظهورها فى وقت مبكر لاعطاء المسئولين فسحة من الوقت يستعدون ويجهزون خلالها كل الوسائل المتوفرة لدى الزراعوجود الكثير الذى لم أتناوله وتطلعت الى السماء داعيا الخالق العظيم الذى خلق كل شىء فأحسن خلقه أن أستطيع معاودة الكتابة ولو أننى أواصل نفس الخط فى هذا الكتاب الذى وضعت له مقترحات عديدة للعنوان سوف أختار منها فى نهاية الاعداد تبعا لما قد يفىء الله سبحانه وتعالى من كرمه وعلمه ويسهل علىّ هذه المهمة الصعبة بسبب تعدد مجالات الموضوع وتشعب تخصصاته وبعضها بعيد عنى بالتخصص . فى النهاية قررت قبول تحدى المعرفة وقلت لا غضاضة ولماذا لا أتعلم وأنهل من هذه المعرفة المتجددة يوما حتى لا أغيب عن الركب وأصبح كما الكذاب فى الزفة أدعى المعرفة وأنا برىء منها تماما . وقلت لنفسى لماذا لا أضيف لمعلوماتى الكثير عن البيولوجيا الجزيئية والتكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية لأنها تمثل أهم التحديات والاقترابات التى ستوصلنا الى الحصول على وسائل فعالة حيويا ضد الآفات الرئيسية ذات تخصص عالى حيث تحقق هدف المكافحة دون أن تضر بالتوازن الحيوى والأعداء الطبيعية ولا يضر بالبيئة بكل مكوناتها بما فيها الإنسان . هذه الاقترابات التكنولوجية تمثل الأمل والحلم لكل من يعمل فى الإنتاج الزراعى ووقاية المزروعات من الآفات فهى وسيلتنا للحصول على أصناف نباتية ذات إنتاجية عالية بمواصفات جودة عالية باقتصاديات مقبولة بمواصفات تتمشى مع المتطلبات العالمية والاقليمية والمحلية للأمان . هذا ليس معناه أن كل ما تقدمه هذه التكنولوجيا ذات أمان مطلق ولكن نتوقع وجود عيوب ولكنها مقبولة وفى جدود المسموح به بصرف النظر عن وجهات النظر فى هذا القبيل .

الكتاب يعالج موضوعان متصلان ومرتبطان بعضهما البعض بل هو موضوع واحد متشابك الأركان رغم تعددها هما وقاية المزروعات بما يضيف للإنتاج جزءا هاما ومؤثر كان يهدر من جراء الإصابة بالآفات والركن الثانى هو وسيلة تحقيق الغاية الأولى والتى تتمثل فى بيولوجيا الجزئيات أو البيولوجيا الجزيئية أو التكنولوجيا الحيوية . سوف أحاول تناول الموضوع من البداية كما يقولون من فرضية واقعية شجاعة تفيد بمحدودية المعرفة

الشخصية فى الركن الثانى ولنتعلم سويا ونطرح التساؤلات كما يجول بالخاطر دون حواجز أو خوف . وقاية المزروعات من غولاء الآفات تناولته العديد من الأقلام وصـــدرت فيــه العديد من الكتب والاصدارات مع آلاف من البحوث فى مجال الآفات والمبيدات ومع هـــذا مازال هناك الكثير الآن وفى المستقبل . اعتمدت مكافحة الآفات على المبيدات منذ منتصف القرن التاسع عشر وحتى الآن بشكل كبير وأوحد لدرجة أن المزارعيـــن تناسـوا أهميـة العمليات الزراعية . لقد ازدهرت صناعة المبيدات كثيرا وبشكل غير مسبوق ولا يوجد مـن ينكر الكثير من النجاحات والأدوار الايجابية التى ساهمت بها المبيدات فى الأمن الغذائـــى العالمى والاقليمى والمحلى بالاضافة الى ما تحقق فى حماية الإنسان من الآفات الحشـــرية وغيرها التى تنقل له مسببات الأمراض الوبائية مثل الملايا والفلايا والطاعون وغيرها . فى نفس الوقت وبسبب عدم التزام مستخدمي المبيدات للتعليمات وفـــى غيـاب دور إيجـابى للشركات المنتجة فى التوعية بمخاطر وأضرار المبيدات حدثت أضـــرار كبـيرة بعضـــها مسجل والغالبية غير موثقة خاصة فى الدول النامية . الاسراف وعدم العقلانية فى اسـتخدام المبديات أدت الى تفاقم ظهور مشكلة مقاومة الآفات لفعل المبيدات ودخول المزارعين فـــى سباق وتحدى مع الآفات انتهت فى معظم الأحوال لصالح الآفات . من المشـــاكل الأخـــرى حدوث مشاكل التلوث البيئى بالمبيدات بدرجات متفاوتة من بلد لآخر ومن قريـــة لأخـــرى انعكس على سلامة وأمان الماء والهواء والنباتات والأســماك والطيـور والإنســان نفســه وحيواناته المستأنسة . زادت المشاكل حدة من جراء التعامل معها بأساليب غير مدروســـة دون وعى تحت مفهوم القضاء على الآفات دون أية اعتبارات أخـــرى وإدخــال وســائل عشوائية أدت الى ظهور مشاكل جديدة .

الشق الثانى يتمثل فى الوسائل التى تؤدى للحصول على عناصر فعالة فى السيطرة على الآفات ولا أقول فى القتل وانما السيطرة وهذا هو التحدى الكبير لأننا جعلنا المـــزارع والمشرف الزراعى يؤمن ايمانا راسخا لا يتزعزع بان وسيلة المكافحة (مبيدات) يجـــب أن تحقق القتل الفورى للآفة المستهدفة . مع حقيقة أن الاتجاهات والاتجاهـــات الحديثـــة فـــى المكافحة والسيطرة على الآفات لا تحقق القتل الفورى وانما تحتاج وقت حتى تصل للــهدف وتحدث التأثير مما يتطلب تحقيق فهم وقبول من يضطلعون بمكافحة الآفات ووقاية النباتـلت بهذه الحقيقة بل عليهم قبول وجود أعداد من الآفات غير مؤثرة على الإنتاجية فيما يعـــرف بمعيار الحدود الحرجة للإصابة . أتساءل الآن ما هى طبيعة المركب الـــذى نحتاجـــه الآن وفى المستقبل من خلال البيولوجيا الجزيئية ؟ نحتاج مركب يحقق هدف المكافحة والسيطرة على الآفات دون احداث تأثيرات بيئية ضارة سواء كان هذا المركب كيميـــائي أو حيويـــي بكتيرى أو فيروسى أو فطرى أو نيماتودى أو مركب ناتج من أى مـــن هـــذه الأحيـــاء أو

التقنيات . لقد شطح خيالى وسألت نفسى هل سيأتى اليوم الذى نحصل فيه على مواد فعالة بيولوجيا تقضى أو تسيطر على الآفات من داخل أجسامها هى نفسها ؟ قلت لماذا لا ؟ ألا توجد السموم فى النمل والثعابين ؟ ألا توجد مواد ضارة أو جاذبة أو قاتلة فى النباتات ؟ ألا توجد نباتات تصطاد الحشرات ؟ مع هذا الاحساس رجعت بى الذاكرة لما نجحت فيه صناعة المبيدات التقليدية من أن عملية الحصول على مركب واحد ناجح فى مكافحة الآفات يتكلف ملايين الدولارات ومن ثم أبعدوا الدول الغلابة من السير فى هذا الاتجاه والاقتصار على الاستيراد منهم . لقد جعلونا نحس بالعجز والآن يتكرر نفس السيناريو حيث يبذلون قصارى الجهد بالطرق المشروعة وغير المشروعة حتى لا تدخل الدول النامية فى عصر ومجالات البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية من خلال امكانياتها الذاتية وبسواعد وخبرات علمائها وهم كثيرون وأكفاء بما فيه الكفاية . لا أغالى إذا قلت أن من بين العلماء فى هذا المجال فى الدول المتقدمة واحد أو أثنين على الأقل من الدول النامية يعملون فى بلاد المهجر فى سيناريو متكرر لا سبيل أمامنا ألا تقبله . أين نحن يا سادة ؟

فى أواخر السبعينيات وبداية الثمانينيات من القرن الماضى وأثناء اشتراكى فى مؤتمرات الكيمياء الزراعية التى تختصر "IUPAC" تلقيت أول اشارة فى إحدى المحاضرات المفتوحة التى يلقيها جهابذة هذا العلم حينما ذهلت من محاضرة بعنوان "البيوتكنولوجيا ووقاية المزروعات" . يومها جال فى خاطرى أننى أعرف القليل عن وقاية النباتات أما ما هى البيوتكنولوجيا ؟ بعدها بدأت تظهر نفس المقالات الرنانة " البيولوجيا الجزيئية ووقاية النباتات " . لقد ازدادت الحيرة أكثر عندما بدأت تطل علينا اقترابات " الهندسة الوراثية ووقاية النباتات " . لقد تولدت لدي والآخرين قناعة بان الفواصل بين العلوم والمعرفة تلاشت أو ذابت الى الأبد . لقد أصبحنا بصدد تعاون علمي جبار بين علماء ومتخصصين هدفهم واحد ألا وهو السيطرة على الآفات من خلال وسائل وعناصر آمنة بعدما استفحلت المشاكل من المبيدات . لا بد أن يتعاون رجال البيولوجى كعلوم أساسية ورجالات الزراعة المعنيين بتحقيق انتاجية عالية من خلال الحفاظ على نمو جيد لنباتات سليمة صحية خالية من الأمراض تتحمل ضرر الآفات ان وجدت ورجال الكيمياء بكل فروعها بداية بالتعامل والتلاعب إن جاز التعبير بهذه الجزيئات المعقدة وطرق تطويعها بما يتمشى مع ضرورة الحصول على جزيئات متميزة تحدث الوهن والضعف فى الآفات دون تأثيرات جانبية ضارة على البيئة والإنسان . الجديد هو الدور الأساسي والكبير لرجال وعلماء الوراثة لأنهم القادرون على احداث تحويرات فى الآفات وفى النباتات العائلة بما يغير من عادات وسلوك الآفات وفي صفات النباتات بما يجعلها غير ملائمة للآفات . هذا ليس بالعمل السهل ولكنه يحتاج الى جهد مضنى وتفانى وتعاون بلا حدود . بعد ذلك يأتى

دور رجالات مكافحة الآفات ومن يعملون في هذا السبيل من البداية وحتى التطبيق واقناع الفلاحين بكفاءة ودور هذه المستجدات الحيوية الآمنة نسبيا فى المكافحة . السؤال الآن هل نحن قادرون على الدخول فى هذا المجال ؟ نعم قدرتنا لا تقل عما هو موجود فى الدول المتقدمة وانما علينا أن نواجه تحدى الوضع السائد فى عدم التعاون بين القطاعات العلمية المختلفة . لو أزيلت هذه العقبة سوف ننطلق كما المارد من القمقم ... ودعواتكم معى ...

رحماك من هذا العذاب الذى يراودنى ويلح على تفكيرى فى شأن الهندسة الوراثية وغيرها من التكنولوجيات الحيوية ... هل هى آمنة حقا كما يقولون ؟ دور هذه التقنيات فى مكافحة الآفات سواء من خلال إحداث خلل فى وظائفها الحيوية أو سلوكها أو إدخال جينات فى النباتات تجعلها مقاومة لهجوم الآفات مقبول ومطلوب . أما ماذا عن أمان هذه النباتات المهندسة وراثيا فهذا محل تساؤل . لقد وجدت بعينى فى مقالة أو تحقيق منقول عن صحيفة الهيرالد تريبيون الدولية تحت عنوان الهندسة الوراثية والتوازن البيولوجى المفقود والصدارة فى جريدة الأهرام يوم السبت ١٢ /٨/٢٠٠٠ وهى كما يلى :

الهندسة الوراثية والتوازن البيولوجى المفقود

فى أحد البساتين بكندا استطاع العلماء تعديل الجينات الوراثية لاشجار التفاح باكسابها خاصية طرد الآفات والميكروبات وانتاج ثمار تفاح اكثر هشاشة واكثر مقاومة ، كما تمتعت أشجار التفاح المعدلة بخاصية جديدة من نوعها وهى ان ثمارها أصبحت لا تتحول الى اللون البنى بعد قطافها كالثمار العادية . على الجانب الآخر استطاع فريقان من العلماء فى ولايتى منيسوتا ونورث كارولينا استنباط سلالات أشجار خشبية جديدة يمكن تحويلها الى عجينة لب الورق بدون الحاجة لاضافة المركبات الكيميائية السامة و التى كانت تتسبب فى تلويث مياه الأنهار اضافة الى اكتساب هذه الأشجار خواص جديدة مثل انتاج أنواع خشب أجود إضافة الى مقاومتها العالية للآفات والميكروبات . الاكتشافان أو التعديلات الأول والثانى اعتبرا إضافتين جديدتين فى عالم الزراعة المعدلة ، وصفهما العلماء بأنهما على قدر عالى من الأهمية وفتحين فى هذا المجال ، لكن الثانى بالتحديد وصف بأنه ثورة زراعية قد تعدل مخزون العالم من الثروة الخضراء وتعيد لكوكب الأرض ولو جزءا قليلا من غاباته المفقودة . رغم كل المزايا التى قدمناها إلا أن قضية الاستعانة بالهندسة الوراثية فى الزراعة ستظل موضع جدل كبير ، فهل حقا ستسعد الهندسة الوراثية البشرية ام انها ستفسد التوازن البيولوجى فى الطبيعة . نفس التساؤل طرح فى أكثر من جهة بعد الاعلان عن الكشفين فالمعارضون يقولون ان الجينات التى يتدخل العلماء فى تعديلها مستعينون بجينات من البكتريا ومن الدجاج وحتى من الإنسان لاكساب النباتات صفات وراثية جديدة ستفسد الطبيعة لأن الأشجار التى عدلوها يعيش عليها مئات الفصائل

الحيوانية والبكتيرية إضافة للطيور التى تعيش على التقاط ثمارها ، فكيف يكون الحال مع هذه الأشجار التى تقف بالمرصاد لكل من تسول له نفسه بالاقتراب سواء كان طائرا أو نوعا من البكتريا ، كما حذر هؤلاء العلماء المعارضون من أن الرياح سوف تنقل ما تفوزه أوراق تلك الأشجار كمقاومة للآفات والاعداء للأشجار الأخرى بحيث تتحول الى آفات فى حد ذاتها للأشجار الأخرى .

المدافعون يرون فى الزراعة المعدلة وبخاصة الأشجار أملا للبشرية ، فقد قدمت تلك الزراعات حتى الآن ٤٠٠ مليار دولار للاقتصاد العالمى بعد استخدامها فى صناعة الورق كما ان هذا الرقم سيزيد خمسين مرة فى العقود المقبلة ، إضافة الى المزايا الأخرى التى سيقدمها ومنها اعادة الثروة الغابية الى سابق عهدها خاصة أنها تتعرض للتآكل منذ فترة بعيدة والبشرية فى أمس الحاجة لاعادتها لانقاذ كوكب الأرض ، والى جانب ذلك فبإمكانها أيضا إمداد الاقتصاد العالمى بما يحتاجه من أخشاب بدون إبادة المخزون العالمى من الغابات مما قد يتسبب فى زيادة درجة حرارة الأرض .

على أية حال وبصرف النظر عن المؤيدين والمعارضين فمن المتوقع أن تظهر أول مزرعة تجارية متخصصة فى إنتاج الخشب المعدل جينيا للنور فى غضون خمس سنوات، بمباركة تامة من إدارة صحة النبات والحيوان الأمريكية ، والتى تتبنى ابحاثا فى هذا المجال منذ فترة طويلة بلغ عددها ١٣٠ بحثا منها ١٦ بحثا خارج الولايات المتحدة فى دول مثل اندونيسيا وشيلى ، وأغلبها كان فى العامين الأخريين مما يعكس اهتمامها بهذه الدراسة واستعدادها الكامل لتبنى القضية أو على الأقل فهى ليست فى صف المعارضين .

الحقيقة أنه من الصعب على أى أحد أن يعرف ماذا يضع هؤلاء العلماء داخل تلك الأشجار لتنمو على هذا النحو ولكن وبشكل مبسط يمكننا القول بأنهم ينزعون من لحاء الشجرة تلك المادة التى تجعل جزع الشجرة صلبا ومتينا أو مادة " اللنجن " وهى المادة التى لابد أن تنزع وتزال من جزع الشجرة عند تحويله لعجينة لب الورق ، وهى عملية مكلفة جدا ، وهم أيضا يقومون بزيادة تنشيط جينات النمو بحيث تنمو الشجرة أسرع ، كما يقومون بتنشيط الجينات التى تزيد تركيز السيليلوز فى جزع الشجرة ، وكما يقول البروفيسير مايكل موينهان من جامعة نيو جيرسى : " فالفكرة تقوم على أساس تغيير شكل انتظام الجينات باضافة المزيد من الجينات فى المنتجات السيليلوزية ، كما يقوم العلماء بإعاقة نمو الزهور والمخروطات الصنوبرية لتركيز طاقة الشجرة نحو الجزء الخشبى لتحقيق اقصى استفادة للشجرة من مادة الـ "دى ان ايه " المعدلة هندسيا " .

نتائج الابحاث الأخيرة لاقت رواجا كبيرا ودعما من الشركات العالمية العاملة في مجال تصنيع الأخشاب والورق وكذلك من شركات السيارات التي تبنت انشاء مزارع خاصة بها ، لأنها متهمة أكثر من غيرها بتلويث الغلاف الجوى ، ولأن هذه الأشجار المعدلة لديها كفاءة عالية فى امتصاص ثانى اكسيد الكربون من الجو فهى تعتبر حلا سحريا لهذه المشكلة من هذه الشركات التى تدعم المشروع شركة تويوتا اليابانية التى تمتلك مزرعة أبحاث خاصة ، تهدف من وراءها الى تخفيف حجم التلوث الناتج عن عوادم السيارات .

يبقى الاتهام الخطير وهو أن هذه الأشجار تضر بالتوازن البيولوجى ، لكن العلماء القائمين على الأبحاث دافعوا عن نظريتهم الجديدة مؤكدين أنها سوف تعيد هذا التوازن المفقود أصلا بإعادة تعديل التوازن بين نسبة الأكسجين وثانى أكسيد الكربون فى الجو ، وباستطاعتها أيضا تحسين حال التربة فهى لا تحتاج عند زراعتها الى مخصبات كيماوية أو رش بالمبيدات ، ومن ثم يمكنها أن تحسن من التربة الملوثة بالمركبات النيتروجينية والمستخدمة فى الزراعة العادة .

والأن لا نملك إلا الانتظار لنعرف إن كانت الزراعة المعدلة نعمة أم نقمة ؟ وهل ستضر بالتوازن البيولوجى أم ستعيده ؟

[عن صحيفة الهيرالد تريبيون الدولية]

بعد أن أخذ بى الخيال مجراه فى اتجاه البيولوجيا الجزيئية Molecuar` biology وجدت خيالى فى كتاب بنفس العنوان للعلماء جورج مارشال وديل والترز بقسم العلوم النباتية بكلية العلوم الزراعية بأسكتلندا أير بالمملكة المتحدة والصادر عن دار النشر Chapman and tlall تحت عنوان " البيولوجيا الجزيئية فى وقاية المزروعات " وهو فى أربعة أجزاء رئيسية الأول يعتبر مدخل ومقدمة للكتاب لجعل القارىء يحس ويستسيغ مفهوم ومعنى البيولوجيا الجزيئية بداية بتركيب الحامض النووى وطرق الكشف عنه وكذلك عزل وتلونة الجينات لأغراض التحول الجينى ومعنى وهدف التحول الجينى فى النباتات . البلب الثانى تناول المكافحة الكيميائية والبيولوجية وهو تناول غنى جدا بالمعلومات التى كنت أتمنى أن أعرفها يوما مثل : الاقترابات الجزيئية لتعميم وسائل كيميائية لحماية المزروعلت ، تصميم وسائل حيوية لنفس الغرض ، خلق مقاومة فى النباتات ضد الكيميائيات المستخدمة فى حماية المزروعات ، تناول الباب الثالث هندسة المقاومة ضد الأمراض النباتية ومبيدات الحشائش والآفات من خلال اتجاهات متعددة مثل : استغلال البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية لتحسين المقاومة ضد الأمراض النباتية وكذلك تقنيات الدفاع الطبيعية فى النباتات من خلال العوامل الوراثية وتناول كذلك تقييم تأثير وأداء النباتات المهندسة وراثيا . الباب

الرابع تناول النواحى التجارية والتشريعية لهذه الاقترابات في ثلاثة موضوعات : البعد التجارى للتكنولوجيا الحيوية فى وقاية النباتات ، النواحى البيئية والتشريعية لاستخدامات النباتات المحورة وراثيا فى الحقول ، نفس النواحى لاستخدامات الكائنات الدقيقة . هذه الموضوعات تغطى جزء كبير مما يدور فى خاطرى ولكنى أواصل البحث فى أمهات الكتب وعلى شاشات الحاسب الآلى من خلال شبكة المعلومات ووجدت فيها الكثير والكثير . كل ما يقلقنى هو الأمان البيئى راجيا ألا نتمكن من حل مشكلة وتخلق مشاكل اخرى يصعب حلها وتمر السنين تباعا تتحدانا وتعقد الأمور ويصعب الحل وندخل فى حلقة مفرغة . الأمر الذى يثير الأمال أن مؤلفى هذا الكتاب تناولا بعقلانية وفهم كبيرين النواحى البيئية والتشريعية وهذا فيه الرد الكافى على من يتشدقون بالأمان المطلق لهذه الاقترابات وما تسفر عنه من وسائل أو مواد تفيد فى مكافحة الآفات .

أحسست بالأمان وشكرت الله سبحانه وتعالى لأنه لم يخذلنى كما هى العادة دائما . فضل كبير ونعمة كبرى فى أننى بعونه وفضله جلت قدرته سوف أتغلب على كل الصعاب التى دارت فى مخيلتى من ناحية صعوبة إعداد هذا الكتاب . بالإضافة الى عشرات الكتب الأجنبية وجدت فى مكتبة الطالب بالكلية الكتاب الذى كنت أتطلع اليه من إعداد أستاذى العالم الكبير أ٠د٠ زيدان السيد عبد العال الذى دائما ما يقترن اسمى باسمه وهذا شرف كبير لى لأنه عالم جليل بكلية الزراعة جامعة الاسكندرية قدم العديد من الكتب للمكتبة العربية كما تخرج على يديه العديد من الزملاء فى الجامعة ومراكز البحث العلمى الأخرى في علوم البستنة . الكتاب بعنوان " التكنولوجيا الجيوية وآفاق القرن الحادى والعشرين " لحماية البيئة – لتنمية زراعية متواصلة ولسد الفجوة الغذائية فى الوطن العربى . الكتاب صادر عن الناشر : شركة منشأة المعارف بالإسكندرية عام ١٩٩٧ . لقد استهل الكتاب بالآية الكريمة " إقرأ باسم ربك الذى خلق ، خلق الإنسان من علق ، إقرأ وربك الأكرم ، الذى علم بالقلم ، علم الإنسان ما لم يعلم " صدق الله العظيم . احتوى الكتاب على إحدى عشر فصلا بداية بأساسيات الهندسة الوراثية ثم مكافحة الحشرات بأسلوب الهندسة الوراثية، الكائنات الدقيقة كركيزة أساسية للتقنية الحيوية وحماية البيئة ، دور التقنية الحيوية فى دعم الزراعة المتواصلة والتنمية الريفية فى الدول العربية ، التكنولوجيا الحيوية (الهندسة الوراثية) والإعجاز العلمى للقرآن الكريم ، الهندسة الوراثية وأفاق القرن الحادى والعشرين، التكنولوجيا الحيوية ودورها فى تنمية الوادى الجديد ، ما هى فوائد البيوتكنولوجى (الهندسة الوراثية) ، أمثلة لإنجازات التكنولوجيا الحيوية ، تكنولوجيا استنساخ البشر حقيقة أم خيال ، وفى النهاية الباب الحادى عشر تناول الاجابات عن السؤال: كيف تحقق مصر الاكتفاء الذاتى من الغذاء . هذه جميعا موضوعات فى صميم

الكتاب الذى أنا بصدده الآن . العديد من التساؤلات والقليل مـــن الإجابــات لأن المجــال مازال فى أول الطريق يتعرض لاجتهادات غير محدودة بسبب تشابك العوامــل المرتبطــة بهذا النوع من المعرفة وكثرة التخصصات العاملة فيه . لا يمكن أن تحقق أية نجاحات فــى أى من الأهداف المطلوبة دون تعاون فرق بحثية كاملة ومتكاملة فى شتى المجالات ....

تحت عنوان " قاعدة تكنولوجية عالية ... للنهوض بالإنتــاج الزراعــي ... إنتــاج أصناف مقاومة للآفات وقصيرة العمر ... الاستفادة من علوم الهندسة الوراثيـــة وزراعــة الأنسجة " فى جريدة الجمهورية يوم ٢٧ يوليو ٢٠٠٠ وهى تبشر بالأمل فى مجال الكتاب.

أعلن الدكتور يوسف والى نائب رئيس الــوزراء ووزيــر الزراعــة واســتصلاح الأراضي أنه يجرى حاليا تكوين قاعدة تكنولوجية عالية فـــى مصـــر للنـــهوض بالإنتــاج الزراعي وتحقيق أكبر عائد من وحدة المساحة والاستفادة من الإمكانيات المتاحة فى ميــاه الري .

قال أن الهندسة الوراثية لعبت دورا كبيراً فى الفترة الماضية حيث تم إنتاج المـــوز الخالي من الأمراض والسلالات قصيرة العمر من الأرز والأصناف المقاومة للآفات مـــن القمح والأرز والذرة الشامية .

- وأوضح نائب رئيس الوزراء أن القاعدة العلمية الجديدة ســوف تســتفيد مــن ذوى الخبرة لدعم بحوث الهندسة الوراثية الزراعية واجراء البحوث الأساسية بهدف ايجاد حلــول لبعض المشاكل بالطرق التقليدية وتوفير الامكانيات المعملية المتقدمة فى نظام ومجال دراسة وتقليل الموروثات والاهتمام بتدريب شباب الباحثين على هذه التكنولوجيات العالية .

أشار الى أن مركز البحوث الزراعية يقوم حاليا باستغلال إمكانياته البحثية فى زيادة قدرة انتاج الهجن واستنباط أصناف ذات انتاجية عالية عن طريق إدخال جينات متخصصــة الى النبات وزيادة مقاومتها للآفات والحشرات والحرارة والجفاف والملوحة عـــن طريـــق الجينات .

أضاف ان القاعدة العلمية الجديدة تقوم على دعم الصلة بين القطاع الخاص الزراعي فى مصر وخارجها والاستعانة بكفاءة المستثمرين الزراعيين فى مجالات إقامة معامل تعتمد على الهندسة الوراثية وزراعة الأنسجة لإنتاج أصناف من الفاكهـــة والخضـــر والزهـــور والنباتات الطبية والعطرية ذات كفاءة عالية فى التسويق مع الاستعانة بالبيئة وحماية صحــة الإنسان . والتوسع فى إنتاج معدات وآلات فرم المخلفات الزراعية للمزارع وإنشاء وحـدات التنبؤ والإنذار المبكر لأمراض النبات الوبائية .

فى كتاب مترجم تحت عنوان " الهندسة الوراثية " تـأليف ويليـام بيـنز وترجمـة أ٠دأحمد مستجير والصادر عن مكتبة الأسرة ٢٠٠٠ من الهيئة المصرية العامة للكتاب وجد أن الكتاب يقع فى أربعة عشر فصلا تناولت الرسالة داخل الجزىء ، الخلية آلة مضبوطة ، واحد من أسباب السرطان ، حتى الجيل الرابع ، أجرومية الرسالة ، أشياء لزوم الشـيء ، التطبيقات الأولى ، المخبرون الوراثيون ، المشـكلة مـع النباتـات والحيوانـات ، نمـو الإنسان ، أحلام ، وكوابيس ، الهندسة الوراثية للجميع بلا استثناء ، أهمية هذا الكتاب أننـى سوف أتبع الترجمة العربية للمصطلحات فى هذا الموضوع الجديد كمـا وصفـها الأسـتاذ الجليل د٠أحمد مستجير العالم فى العلوم الوراثية وعضو مجمع اللغة العربية . لقد تنـاولت المقدمة ما أشار اليه العلماء فى أواسط الستينيات من أننا غدونا على شفا ثورة الكمبيوتـر وفى منتصف السبعينيات أصبحنا على شفا ثورة بيولوجية فقد تقدمت تكنولوجيا الهندسـية الوراثية للحد الذى أصبحنا نتطلع الى اليوم الذى سنتمكن فيه من بناء الكائنات الحية بنفـس السهولة التى نبنى بها الكمبيوتر الآن . لأن الهندسة الوراثية علم يتعلق بالحياة لا بالرياضـة البحثية فقد سببت الثورة البيولوجية ارتباكا للمتنبئين المحترفين ... ان الفارق بيـن ثـورة الكمبيوتر والثورة البيولوجية هو الفارق بين الإنسـالى (الإنسـان الآلـى أو الروبـوط) والإنسان .

تناول هذا الكتاب الموضوعات التالية :

الباب الاول	مقدمة في التكنولوجيا الجزيئية
الباب الثاني	البعد الاول للتحسين الوراثي للنباتات : زيادة الانتاجية والجودة
الباب الثالث	الاقترابات الجزيئية للحصول علي كيميائيات لحماية المزروعات
الباب الرابع	الاقترابات الجزيئية لتقييم الحصول علـي مـواد حيويـة لحمايـة النباتات
الباب الخامس	المحددات الجزيئية لتحقيـق المقاومـة ضـد كيميائيـات وقايـة المزروعات
الباب السادس	التكنولوجيا الحيوية والمكافحة الحيوية للافات
الباب السابع	التكنولوجيا الحيوية والمبيدات ومكافحة الافات
الباب الثامن	التكنولوجيا الحيوية : صناعة بلا يين الدولارات
الباب التاسع	التأثيرات الايكولوجية للنباتات المهندسة وراثيا

الباب الأول
مقدمة فى التكنولوجيا الجزيئية

مقدمــــــــــة :

من الصعوبة بمكان أن نجد تفسيرات واضحة وشرح مؤكد عن الطرق والنظريـات المرتبطة بالتكنولوجيا الجزيئية فى المراجع والدراسات المرجعية .الاصـــدارات الخاصـة بالبحوث الجارية نادراً ما تتناول بالشرح النظريات التى تقف خلف الطرق المستخدمة ممـا يجعل على الدراسين مهمة البحث والاضطلاع فى موضوع شائك . فى هذا المقام سـوف نتناول تبسيط المصطلحات والمعلومات عن الأحماض النووية وطـرق فصلـها وعزلـها واستخدامها فى التحوير الوراثى فى النباتات . لقد بدأت ثورة الهندسة الوراثية فى الفترة ما بين ١٩٦٩ ، ١٩٧١ – على شكل محاولات فردية فى بحوث أكاديمية . بحلول عام ١٩٧٣ بدأنا نسمع عن الهندسة الوراثية من خلال مقالات هستيرية من الصحافة ورجالات الإعلام. لقد بدأت تظهر مصطلحات جديدة لم يتصورها عقل العديد من البحاث والعلماء آنذاك مثـل "الـ د ن أ المطعم ، البلازميدات ، الكلونات ..." لقد كان التفاؤل كبيرا تحت عناوين مثيرة من أن التكنولوجيات الجديدة ستحل كل المشاكل المتعلقة بالأمن الغذائى ولن يكـون هنـاك جوعى فى المستقبل القريب ولن يكون هناك سرطان ولا إيدز وغيرها من الأمراض الفتاكة حيث سيصبح كل شىء غير مرغوب تحت السيطرة . كان هناك مؤيدون ومـهللون لـهذا الفيض غير المسبوق وشطحت الآمال ولكن على الجانب الآخر كـان هنـاك معـارضون ومتشائمون الذين أعلنوا أن التكنولوجيات الجديدة سوف تهدد استقرار الحياة على الأرض. هذا ما دار وما زال فى خيالى حيث أتوقع أن تحمل هذه التكنولوجيـات السـم الزعـاف وينطبق عليها القول " فى ظاهره الرحمة وباطنه العذاب " .

السؤال الآن : هل نحن فى حاجة الى التكنولوجيا الجزيئية أو الحيويـة بمـا فيـها الهندسة الوراثية ؟ نعم نحن فى أمس الحاجة لهذه الثورة العلمية الرابعة التى أتفـق علـى تسميتها " البيوتكنولوجى " . سؤال آخر من أين بدأت وأتت هذه الثورة ؟ لقد أتت بفيض من الخالق سبحانه وتعالى الذى خلق كل شىء فأحسن خلقه ... تبارك الله أحسن الخـالقين ... أتت من جراء نتائج الدراسات المستفيضة والمتأنية طويلة البال والمال عن تركيب وكيمياء ووظيفة المادة الوراثية فى مخلوقات الله القادر الوهاب السميع العليم . حدث ذلك بعدما تأكد أن المواد الوراثية (هل أكثر من مادة ؟ هل تختلف من كائن لآخر ؟) توجد مرتبـة فـى بنيان مرصوص لا خلل فيه بمقدار وقدرة إلهية فى شرائط حلزونية من الأحماض النوويـة

التى تحتوى على الشفرة (أو الشفرات) التى تحقق خواص الوظائف لكل كائن حـــى فـــى الجيل والأجيال اللاحقة . لذلك لن تكون هناك غرابة فى بداية هذا التقديم بالافصـــاح عـــن مكنون تركيب وأسرار الحمض النووى " دنا DNA " الذى تم الكشف عن كونه حلـــزون مزدوج فى الخمسينيات تم الكشف عن الشفرة الوراثية فى الستينيات من القرن الذى انقضى وبعدها بعشر سنوات تم تطوير مفاهيم وأسس الهندسة الوراثية . لكل كشف ميعاده وأوانـــه عندما يأذن الخالق العظيم . يا سادة كل ما نحن بصدده ليس فيه أى خلق حاشـــا لله وإنمـــا اجتهاد فى مكونات خلق الله وعلى الله قصد السبيل . إذا كانت النية والقصد سيئة من جانبنا كان الدمار وإن كان خيراً فالخير كل الخير .

لكى نسهل الأمر على القارىء وعلى نفسى أيضا أقول أن هذا الحلـــزون "DNA" يمكن فكه وتقطيعه الى قطع من خلال انزيم معين ثم يمكن إعادة تركيبه أو تجميعـــه مـــرة أخرى مع نفس القطع الخاصة به أو مع قطع من حلزون DNA آخر غريب عليـــه وقـــد يكون من كائن آخر وهذا لا يمكن أن يحدث طبيعيا فـــى التكـــاثر المـــألوف منعـــا لخلـــط الانساب وما يستتبعه من مشاكل لا حدود لها والتى بدأت تظهر مع بداية ظـــهور الهندســـة الوراثية والتجارب الأولية فى مجال الاستنساخ وظهور الهوس الانسانى كما تعودنا علـــى مر العصور . بالرغم من الآمال المعلقة على التكنولوجيـــا الحيويـــة إلا أن الرعـــب مـــن مردوداتها قاتل . من كان يتصور أن يجىء اليوم الذى يجهز العلماء عامل وراثى (جيـــن) تفصيل أى كما هو مطلوب ومرغوب يشفر بحيث يحقق ما يملى عليه بلا إرادة . الســـؤال الآن ماذا يحدث إذا لم تعبر الوظيفة التى تم هندستها عن نفســـها فـــى المكـــان الصحيـــح والتوقيت المناسب؟ ماذا يحدث من خلل إذا حدث خطأً فى هندسة المادة الوراثيـــة ؟ هـــل يمكن تصحيحه ؟ هل يستطيع الكائن المهندس فى حالة نجاح الحصول عليـــه القيـــام بكـــل الوظائف والمهام المطلوبة منه ويصبح قادر على المنافسة مع أقرانه الطبيعييـــن ؟ أســـئلة كثيرة ....

قد يتبادر فى ذهن القارىء ما هى الثورات الأربعة التى حدثت فى القرن العشرين ؟ لقد ذكرت قبلا أن الثورة الرابعة هى " التكنولوجيا الجزيئية " أما الثلاثـــة الأخـــرى فـــهى تحطيم الذرة وثورة غزو الفضاء ثم الكمبيوتر . أنا من عندى أقول أننا فـــى صـــدد ثـــورة خامسة هى " ثورة تكنولوجيا المواصلات " ها هو العالم المتقدم يبيع لنا الهواء فـــى شـــكل موجات سلكية ولا سلكية عبر الانترنت والتليفون المحمول وغيرها . ها هم دهنوا الـــهواء دوكو وجملوه ويبيعونه لنا ... بدأت سؤالى : هل نحن فى حاجة لهذه التكنولوجيـــا عاليـــة التقدم ؟ أقول أننا بصدد الزراعة أى إنتاج الغذاء والكساء والدواء والوقـــود (الطاقـــة) . التحدى الأكبر يتمثل فى الطاقة ... أليست حرب الخليج والمطرقة الأمريكية التى تعيث فى

الارض فسادا دون رحمة أو إنسانية بسبب وسائل ومصادر الطاقة . دور التكنولوجيا الجزيئية فى إنتاج الغذاء والكساء يقبله العقل بسهولة أما دورها فى الحصول على الطاقة أمر يصعب فهمه وإدراكه ... دور التكنولوجيا الحيوية فى تقليل استهلاك الطاقة ممكن ومطلوب حيث ستؤدى الى تقليل استخدام الأسمدة الكيميائية والمبيدات مما ينعكس إيجابا فى تقليل مشاكل التلوث البيئى والحفاظ على صحة الإنسان والحيوان والنبات وغيرها . إذا كانت الزراعة فى أمريكا تمثل قيمة تريليون دولار ... أليست إدخال التكنولوجيا الجزيئية تستحق التعب والمعاناة . الكل على قناعة بضرورة تضاعف إنتاج الحبوب على مستوى العالم خلال ٢٥ عاماً بسبب زيادة السكان وحاجة الأفواه الجائعة الى الطعام مع ظهور كوارث بيئية خطيرة هنا وهناك خاصة شح المياه وتوقف الأمطار .

لكى نقرب الى الأذهان أهمية هذا الاقتراب الجديد نقول أن العالم ينفق حوالى ١١٣ بليون دولار توزع على النحو التالى : ٥٩ بليون للأسمدة ، ٣٢ بليون للبذور ، ٢٢ بليون للمبيدات . تشير التقديرات أن ما تم إنفاقه عام ١٩٨٥ فى بداية الثورة الرابعة بلغ ٤ بليون دولار فقط لتطوير التكنولوجيا الجزيئية خص الزراعة ما يقرب من مليار واحد فقط منها ٦٠٠ مليون دولار للبذور والباقى على الميكروبيولوجيا الزراعية .

تركيب وتحليل الحمض النووى

السؤال المطروح دوما ودائما هل الحمض النووي " دنا DNA هو المادة الوراثية".
بعد الكشف عن الميكروسكوب العادي وحتى الإلكتروني أمكن معرفة كل أسرار المواد الحية نباتية وحيوانية فى الكينونة المعروفة بالخلية أو أساس الحياة وهى وحدة الحياة بها النواة وحولها السيتوبلازم وقد أدى ذلك الى معرفة الانقسام المباشر وغير المباشر . مرة أخرى أذكر أن الثورة التكنولوجية الرابعة تلعب وتحور وتغير فى المادة الوراثية الموجودة فى الخلية وهى من خلق الله سبحانه وتعالى لن يستطيع الإنسان الآن وفى المستقبل حتى قيام الساعة من خلق خلية حية ... فى عام ١٨٦٠ تم الكشف عن الكروموسومات داخل نواة الخلايا وهى تختلف فى الشكل والحجم وهى ثابتة العدد للنوع الواحد وتوجد فى أزواج فى الخلايا الجسمية (2N) أحدهما من الأب والآخر من الأم . الكروموسومات هى التى تحمل المادة الوراثية . لقد تأكد ذلك من دراسات مندل على البسلة ١٨٦٥ والعلماء ستيفانس وولسون فى جامعة كولومبيا بأمريكا ١٩٠٥ على الجنس فى الإنسان اللذان أكدا أن الذكر هو الذى يحدد نوع الجنين إما أنثى (XX) أو ذكر (XY) . فى عام ١٩١٢ عرف أن الجينات مرتبة طوليا على الكروموسوم ثم توالت الاكتشافات الخاصة بالطفرات

التى تحدث من جراء التعرض للأشعة السينية . هل يمكن للعقل أن يتصور وجود ١٥٠٠ عامل وراثى على الكروموسومات الأربعة فى حشرة ذبابة الفاكهة .

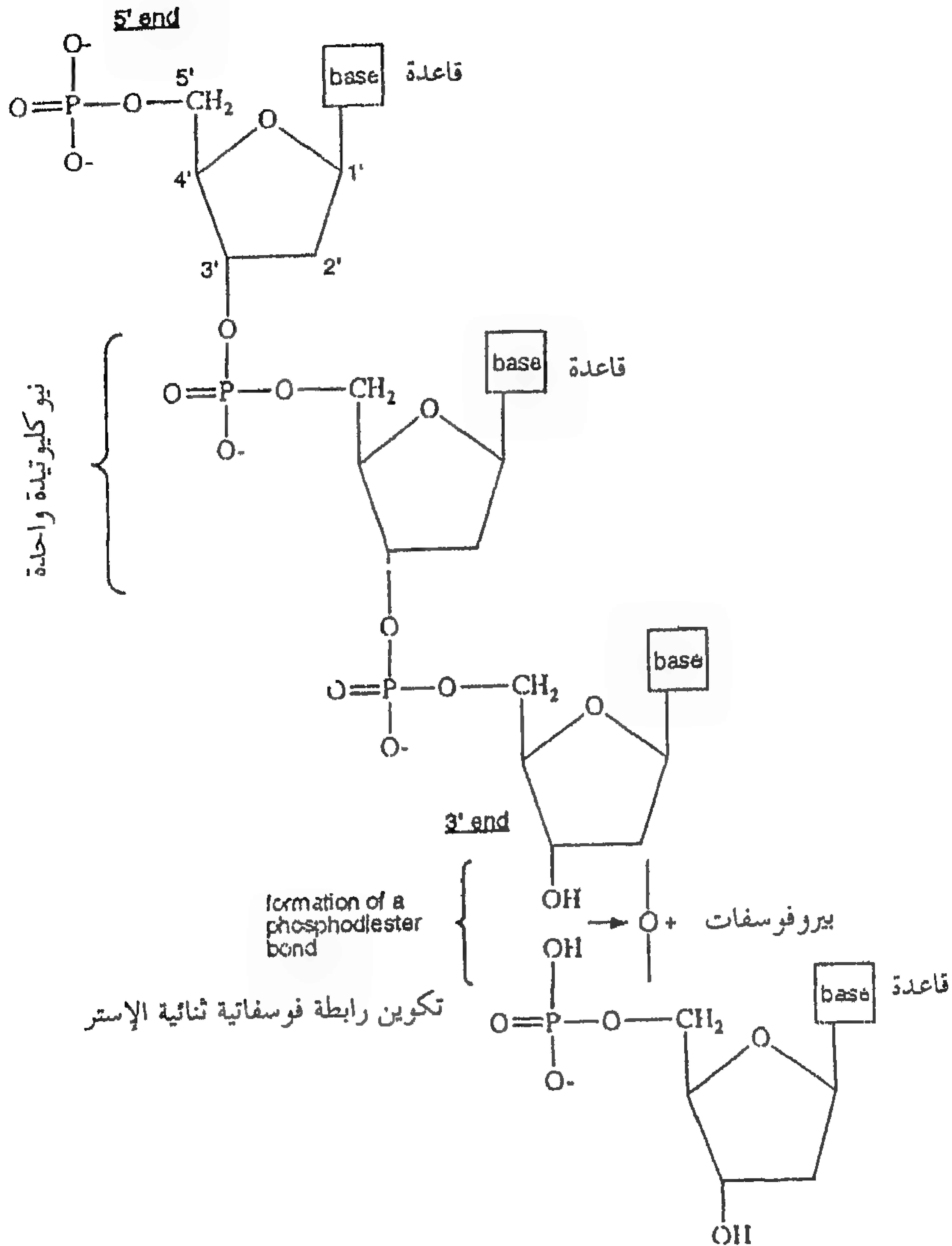
كان يعتقد فى البداية أن الحياة تعتمد على وجود مواد مساعدة داخل الخلية تساعد على تصنيع وتحليل الروابط الكيميائية سميت بداية بمواد التخمير ثم تحولت الى التسمية انزيمات . ثبت من البحوث والدراسات أن لكل تفاعل انزيم خاص وكل خلية بها أكثر من ألف انزيم وجميعها ذات طبيعة بروتينية . بعد ذلك تم الكشف عن البروتينات والتى تتكون من سلاسل ببتيدية تتكون أساساً من أحماض أمينية . فى الأربعينيات تم التعرف على الجينات هى التى تتحكم فى تكوين الانزيمات داخل الخلية . وهنا كانت البداية حيث تولد لدى الباحثين قناعة بإمكانية استغلال التقنية الحيوية فى تحقيق طفرات فى الإنتاج الزراعى والصناعى والحصول على أدوية نظيفة من خلال هندسة الكائنات الحية وكان التطلع نحو الإيجابيات مع مواراة الأنظار عن المضار . لقد وجد العلماء ضالتهم فى اتجاهات ثلاثة هى الحمض النووى " دنا DNA " والأجسام المكلونة الأحادية وزراعة الخلية والأنسجة . واضح أن هذه الاقترابات تحتاج بل تحتم تعاون ومشاركة العديد من العلوم فى تناسق خاصة الوراثة والبكتريا والفيروس وتربية النباتات وكل أفرع البيولوجى والكيمياء الحيوية وعلوم وظائف الأعضاء وغيرها . المهم هو التخطيط السليم ووضع أولويات نحو الوصول للهدف .

تركيب الحمض النووى " دنا DNA "

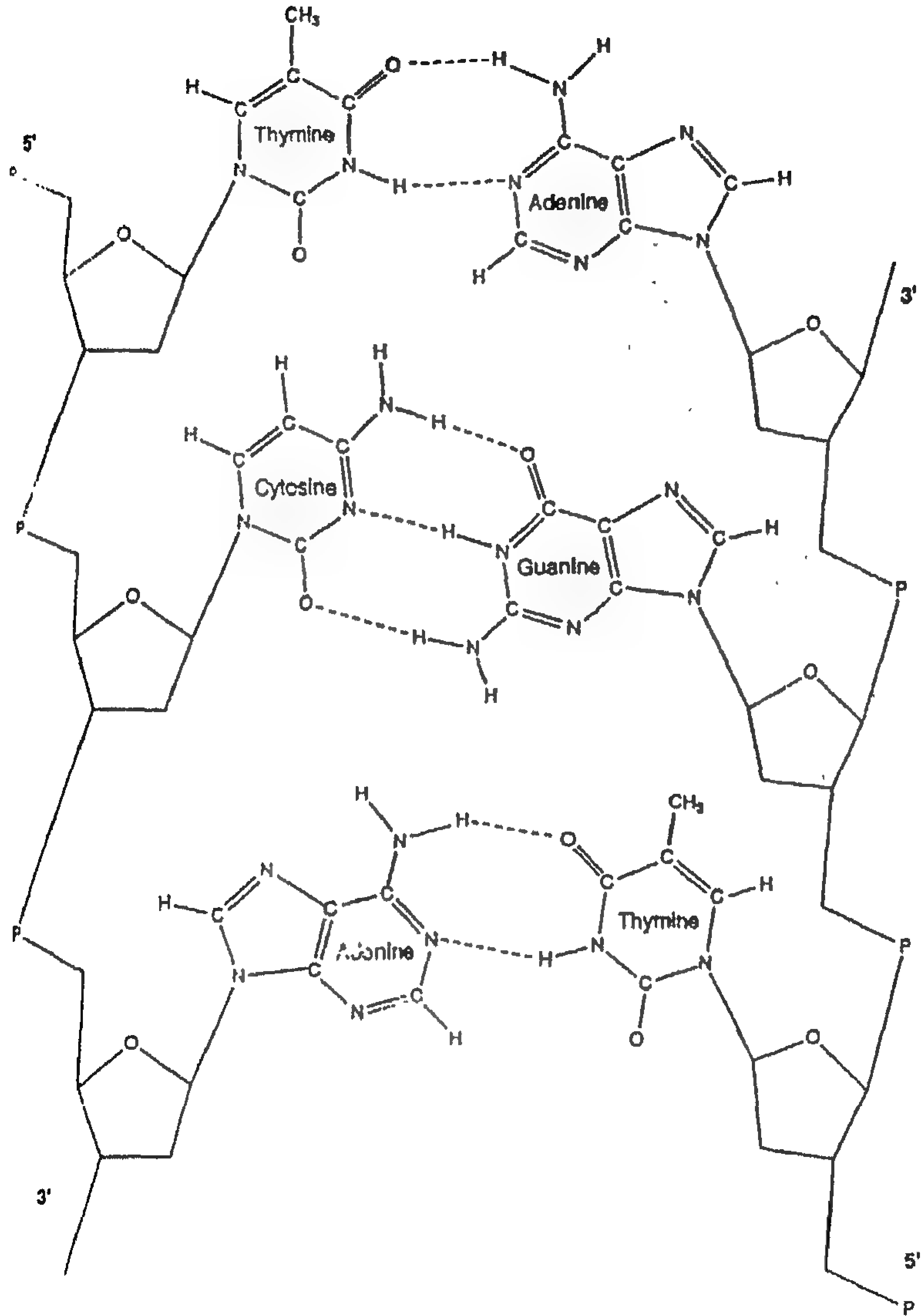
بعد الجدل والمناقشات أتفق على أن حامض الديوكسى ريبونيوكليك (DNA) يخزن وينقل المعلومة الوراثية كما هى وأنه يعتبر الجزىء الأساسى للحياة . فى العادة يوجد الحمض "دنا" على شريطين خيطين بوليمرية كل منها يتكون من تحت وحدات يطلق عليها النيوكليتيدات يحتوى على سكر البنتوز (ديوكسى ريبوز) ، مجموعة فوسفات وواحد من أربعة جزيئات قاعدية عضوية متميزة اثنان منها هى البيورينات مثل الادينين (A) والجوانين (G) واثنان منهما عبارة عن البيريميونات مثل السيتوسين (C) والثيامين (T) . ترتبط النيوكليتيدات بروابط الفوسفو ثنائي الإستر فى تتابع متميز وبطريق يحقق توجيه معين (شكل ١-١) . شريطى جزىء DNA تتزاوج فى أسلوب متوازى معاكس (توجيه عكسى) تبعا للتكامل الكيميائى بين قواعد النيوكلتيد مثل الادينين الذى دائما ما يتزاوج مع الثيامين ، الجوانين مع السيتوسين بواسطة الروابط الايدروجينية (شكل ١-٢) . شريطى الدنا تكون إهليج مزدوج بشكل عائلي مع أزواج القواعد التى توجد بين الأجنحة الداخلية لامتدادات السكر والفوسفات . التركيب الاهليجى المزدوج " للدنا" شديد الثبات وأن الشرائط الخاصة "بالدنا" فى الداخل in vivo لا تجنح وتنفصل فى أسلوب موضعي خلال

التضاعف والاستنساخ . فى الخارج حيث يمكن الفصل الكامل للجزيئات الخطية من خلال التسخين يتكون محلول "الدنا" المنصهر على درجة ٩٥°م . هذا الفصل والتغيير عن الشكل الطبيعى denaturation يمكن أن ينعكس من خلال خفض الحرارة حيث تعاود أشرطة الدنا الشكل الطبيعى كما كانت قبل بداية التحلل أو التسخين الحرارى . معاودة الشكل التهجينى rehybridize والتوازن المضاد antiparallel والشكل المتكامل complementary fashion من الأمور الهامة واجبة التناول .

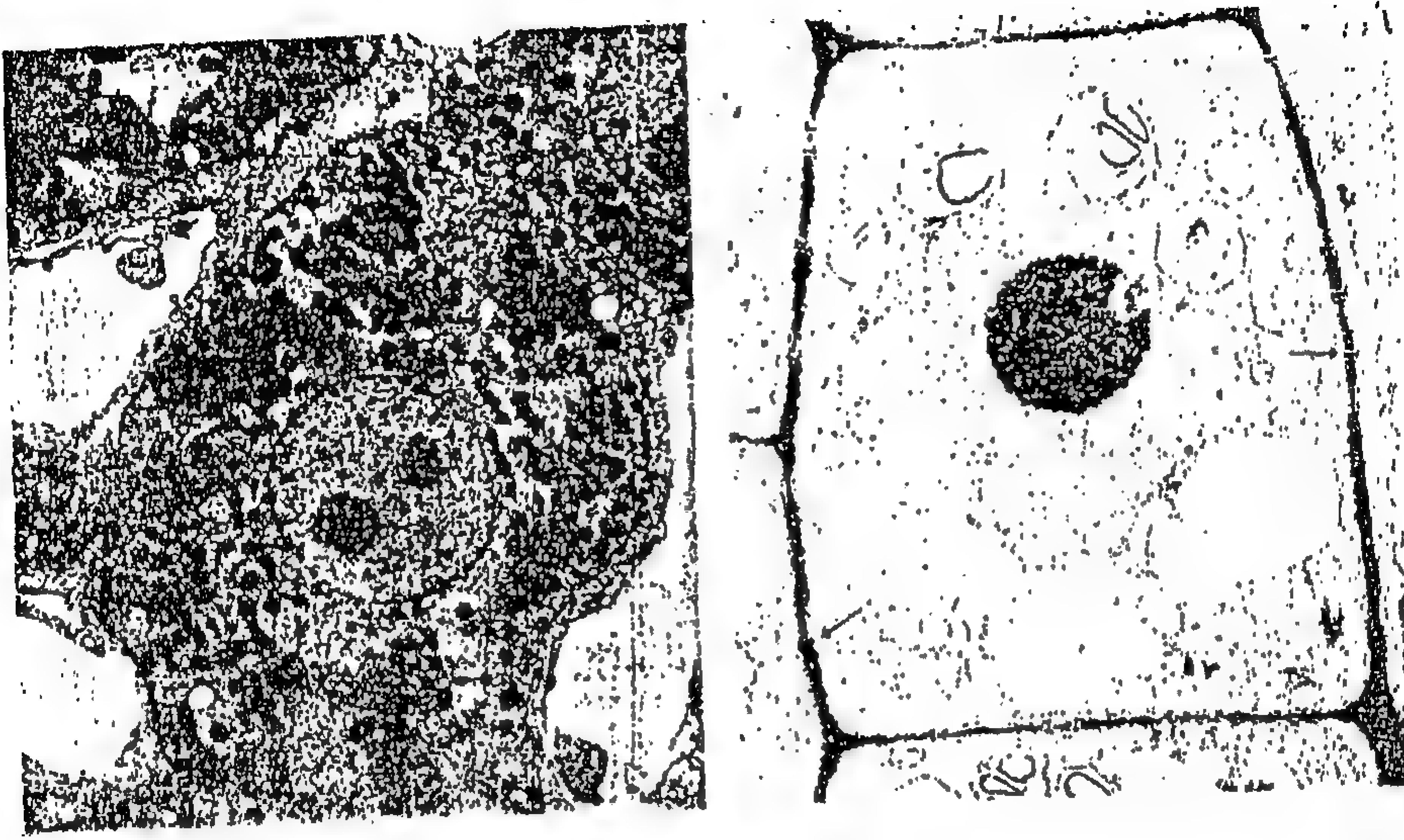
حتى لا يتوه القارىء فى بحر المعلومات عن " الدنا DNA " ذات الطبيعة البروتينية بل هي بروتين خاص من سلاسل من الببتيدات رأيت أن استعرض بإيجاز شديد التركيب العام للخلية كما جاء فى كتاب زميلي وأخي الفاضل أ٠د٠ فتحي محمد عبد التواب أستاذ الوراثة بزراعة عين شمس بعنوان " بيولوجيا ووراثة الخلية " اصدار الدار العربية للنشر والتوزيع بالقاهرة . الشكل (١-٣) يبين التركيب العام لخلية حيوانية نموذجية وخلية نباتية وصورة مجهزة بالمجهر الالكترونى لكل منهما . الخلية تتكون من غشاء بلازمى شبه منفذ يحيط الخلية من الخارج ويحميها من الظروف البيئية المعاكسة المحيطة بها ثم السيتوبلازم (ينقسم الى اكتوبلازم خارجي واندوبلازم داخلي) ومنه تحدث كل الوظائف الحيوية للخلية وهو يحتوى على عدد من العضيات لكل منها وظائف محددة للحفاظ على نشاط الخلية وتجددها . من هذه العضيات الشبكة الاندوبلازمية وقد ورد ذكرها كثيرا فى دراسات التوكسيكولوجى حيث أن من خلال تركيبها من أغشية حوصلية تسمح بالفصل بين التفاعلات الكيميائية والحيوية المتخصصة وفيها الشبكة الخشنة لوجود الريبوسومات على سطحها وهى تشارك فى البناء الحيوى للبروتين أما الشبكة الملساء الخالية من الريبوسومات تلعب دور كبير فى بناء بعض الهورمونات الاستيرودية وإزالة سمية بعض المركبات السامة وفى تكوين الصفائح الدموية ... سبحانك يا رب . يوجد كذلك جهاز جولجي أعلى النواة ويختص بتركيز ومعالجة وتعبئة وتوزيع النواتج الافرازية بالخلية . من العضيدات الهامة الميتوكوندريا وتسمى بيت الطاقة للخلية كما يتم بها تخزين وتنظيم أيونات الكالسيوم وتتم بها دورة حامض الستريك (دورة كربس) للتنفس الهوائى . يوجد الجسم المركزى فى الخلية الحيوانية فقط ويلعب دور كبير فى انقسام الخلية . النواة هى بيت القصيد فى موضوعنا حيث يوجد سائل نووى به عديد من المركبات والجزيئات المختلفة مثل البروتينات وبعض الأحماض النووية كما تسبح الشبكة الكروماتينية فى السائل النووى وهى التى تحمل المادة الوراثية . تتكون مادة الكروماتين من بروتينات نووية التى تتحلل مائيا الى أحماض نووية "DNA" تحمل المعلومات الوراثية حسب تتابع قواعدها النتروجينية فى تتابع الشفرات الوراثية .

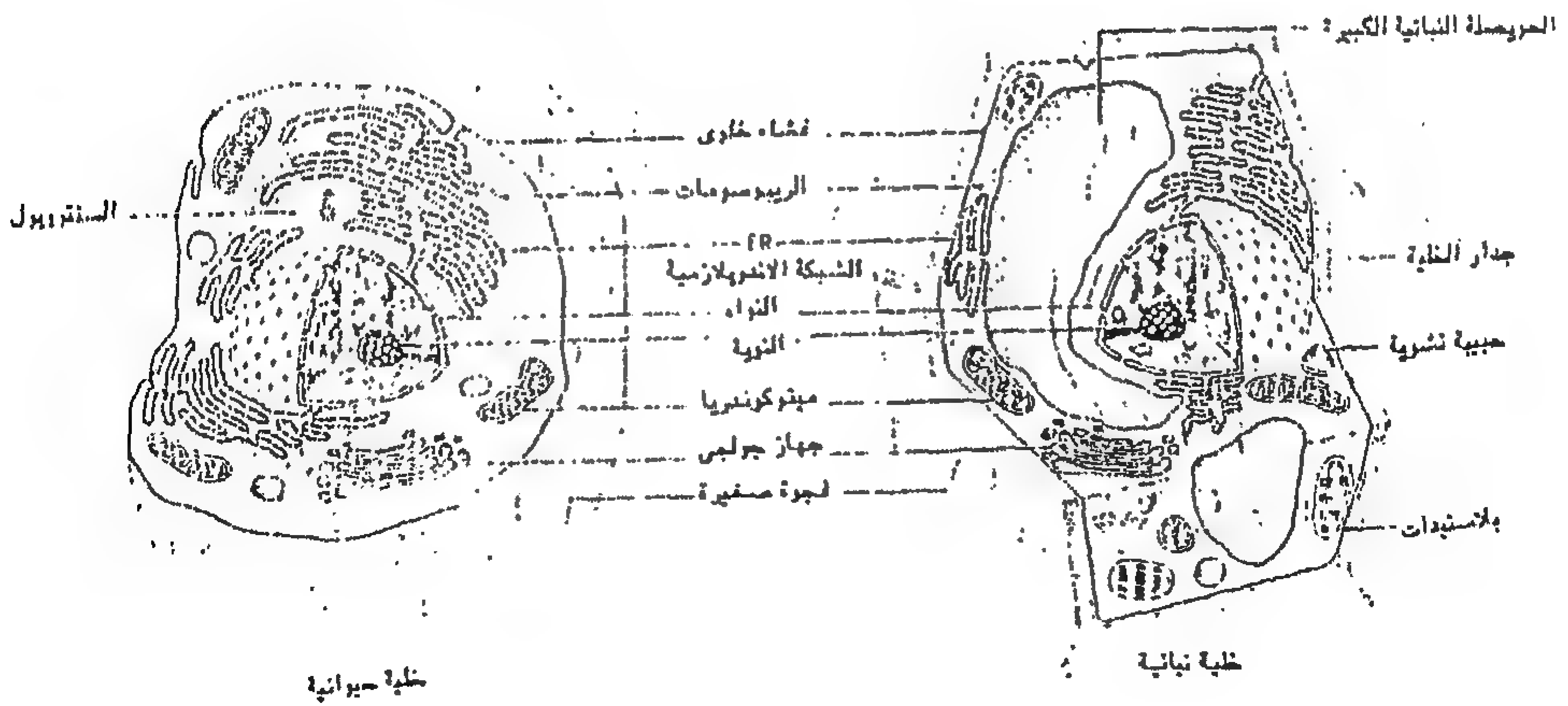


شكل (١-١) : تتابع النيوكليتيدات العديدة موضحا التوجيه على المواقــع 5 ، 3 المرتبطــة والمقــابل لمجموعة الفوسفات الحرة عند موضع الكربون (5) (فى القمة) ومجموعة الايدروكسـيل الحرة عند موضع الكربون (3) لحلقة الديوكسى ريبوز (فى القاع) على التوالى . تحـت تأثير ليجيز DNA والنيوكلوسيد تراى فوسفات يمكن أن يكون رابطة الفوسفو داى إستر مع نهاية (3) من الجزىء .



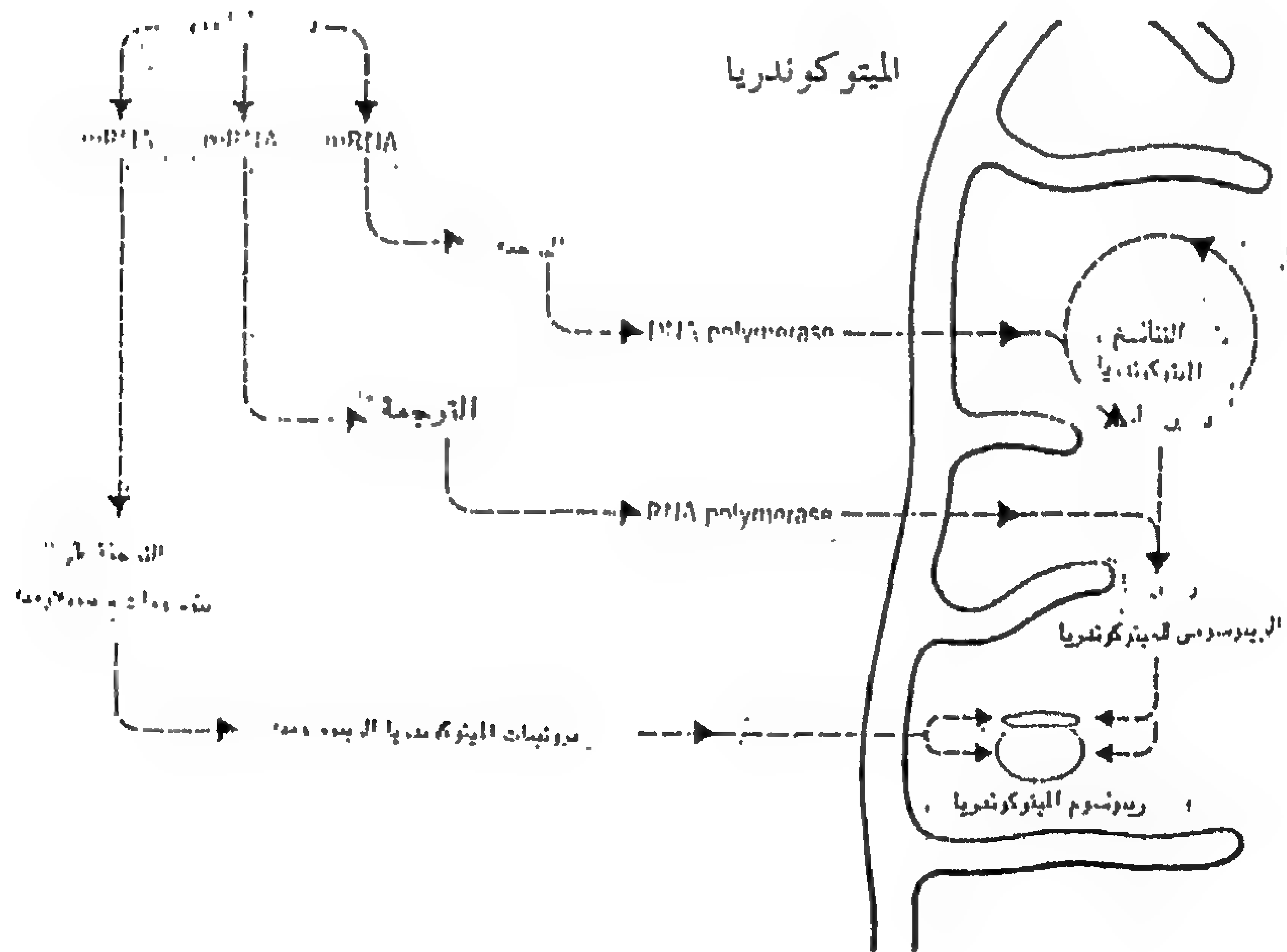
شكل (١-٢) : التركيب ثنائى الأبعاد لمركب Bb_p من جزىء "الدنا DNA" ثنائى الأشـرطة يوضـح أزواج مضادة التوازى لشريطين متكاملين ممسوكين معا من خلال الروابط الايدروجينيـة المتخصصة .





(شكل ١-٣) : التركيب العام لخلية حيوانية نموذجية ، وخلية نباتية وصورة بالمجهر الإلكترونى لكل منهما .

لقد أشار أ٠د٠ فتحى عبد التواب الى تركيب ووظيفة " دنا DNA " الميتوكوندريا حيث أنه عبارة عن شريط قصير جدا بالمقارنة " بدنا النواة " ويوجد فى شكل حلقبى فى الماتركس من ٢ – ٦ نسخ فى الميتوكوندريا الواحدة مما يعطى الخلية عدد اجمالى من الدنا mt DNA ١٠^٨ أو أكثر تبعا لعدد الميتوكوندريا فى الخلية . قد تتشابك حلقات الدنا الميتوكونديرى فى شكل يشبه الجنزير أو السلسلة . يقوم هذا الدنا بأدوار مماثلة للدنا النووى nDNA فى الخلايا المميزة النواه حيث يستطيع نسخ أنواع من الحمض النووى ريبونيوكليك أسيد RNA على الرغم من تشابه الأدوار إلا أن النواتج تكون مختلفة تماما . هذا معناه أن الجهاز الوراثى فى النواة والميتوكوندريا لا ينتج نواتج مشتركة حيث أن الجهاز الوراثى فى الميتوكوندريا يعتمد بشكل كبير على الجهاز الوراثى للنواة بينما تعتمد الخلية نفسها على الميتوكوندريا فى أداء وظائفها والحصول على ما تحتاجه من طاقة . الشكل (١-٤) يوضح العلاقة الوظيفية بين د٠ن٠أ النواة ، الميتوكوندريا .



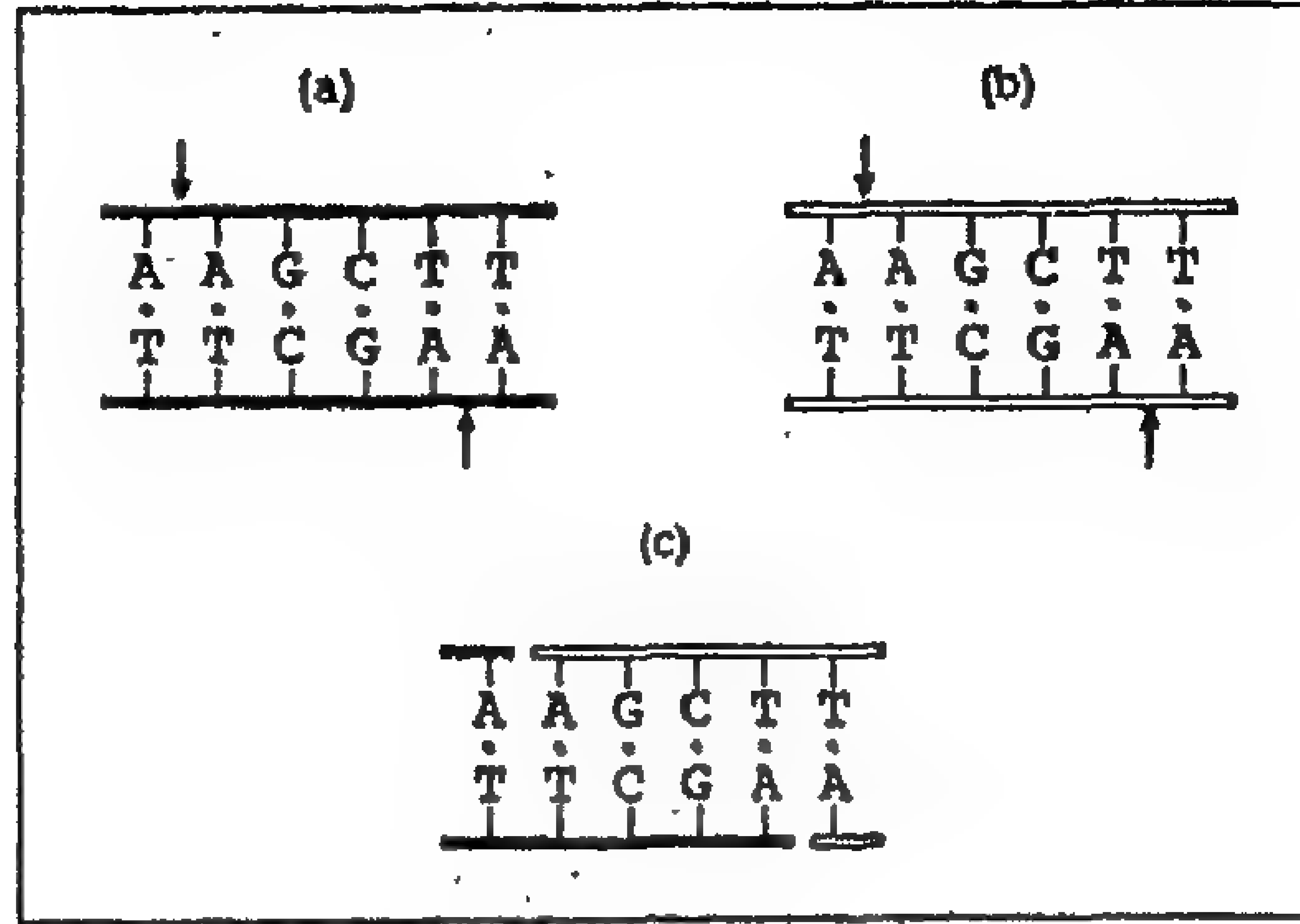
شكل (١-٤) : شكل تخطيطى يبين العلاقة الوظيفية بين د٠ن٠أ النواة و د٠ن٠أ ٠ الميتوكوندريا .

عزل الدنا DNA فى المعمل

إن وجود انزيمات النيوكليزيس فى البكتريا على الجلد وبعض الرتب من الكيميائيات التجارية تعنى ضرورة اتخاذ بعض الاحتياجات الهامة عند العمل على الدنا العارى . تشمل هذه الاحتياجات لبس القفازات الخاصة بالجراحة عند تداول جميع الجواهر الكشافة . كل هذه الجواهر الكشافة نفسها يجب أن تعقم فى الأوتوكلاف وتخزن فى أوعية معقمة بالحرارة ومغسولة بالحامض والمصنوعة من السليكون . توجد طرق عديدة ومتنوعة لعزل الحمض النووى "دنا" من الخلايا والأنسجة . فى العادة وبوجه عام توجد ثلاثة أهداف شائعة لمعظم البروتوكولات . فى البداية يتم تجهيز مستخلص الخلية فى محلول منظم مائى مناسب . اعتمادا على مصدر المادة فأنها قد تتطلب محلل بسيط للخلية أو هراس قوى للنسيج . بعد ذلك يعامل المستخلص بالمذيبات العضوية مثل الكلوروفورم و/ أو الفينول على درجة حموضة قلوية لترسيب البروتين . يتم استرجاع والحفاظ على "دنا" فى الوسط المائى . فى النهاية يتم ترسيب " الدنا " من خلال المحلول المائى المنقى جزئيا بإضافة الكحول والتحضين على حرارة منخفضة فى وجود ملح (مثل خلال الصوديوم) ومعاودة التعلق فى الماء أو المحلول المنظم مع التركيز المطلوب (تقدر بالطريقة الاسبكتروفوتومترية). لقد أجريت العديد من التحويرات على هذا البروتوكول .

تقطيع وتوصيل الحمض النووى " دنا DNA "

يمكن تقطيع " الدنا " أو تقييده باستخدام انزيمات بكتيرية منقاة تسمى انزيمات اندونيوكليزيس التقطيع . هذه البكتريا تتعرف على تتابع قاعدة خاصة " التمييز " وتكسر "الدنا" من خلال تتابع هذه القاعدة . متاح حاليا ما يزيد عن ٢٠٠ من انزيمات التقطيع على المستوى التجارى كل منها قادر على تكسير " الدنا " عند موقع خاص بالرغم من أن بعضها تستطيع تمييز والتعرف على التتابع وتسمى isoschizomers وسوف نتناولها بالتفصيل فيما بعد . من الأمثلة هند ٣ Hind III المشتق من البكتريا " هيموفيلليس انفلونزا RD والتى تكسر "الدنا " كما فى الشكل (١-٥) . لقد لوحظ أن Hind III يولد قطع مذهل أو منظم staggered فى جزىء الدنا ثنائى الشريط معطيا ذيول شريطية مفردة قصيرة تعرف بالنهايات اللاصقة أو الملتصقة . تفيد هذه النهايات فى إعادة دمج "الدنا" لأنها تقدم التركيب الابتدائى فى لحم قطعتين من " الدنا " التى تم تقييدها بنفس الانزيم ويحدث اكتمال للرابطة بفعل الانزيم " دنا ليجيز " . توجد كذلك طرق لربط النهايات أو مكونات النهايات غير الحادة والتى تتضمن فى العادة تحوير انزيمى لهذه النهايات متوفرة كذلك .



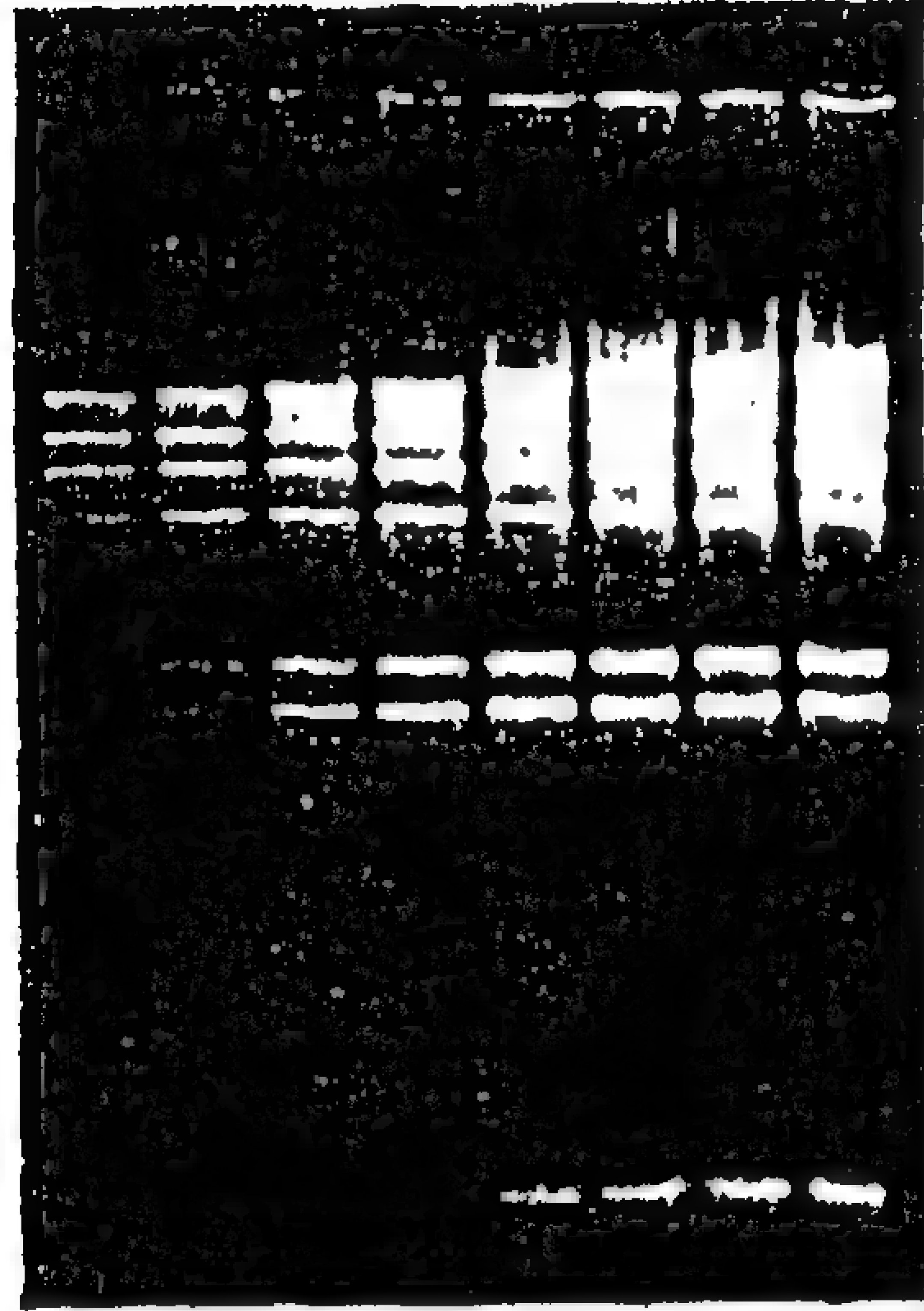
شكل (١-٥) : تمثل الانزيم الخاص بالتقييد Hind III الذى يخلق قطعة فى الدنا عند النقاط الموضحة . (b) النهايتان المتوافقتان اللصيقتان . تقدم التركيب الابتدائى لربط الجزيئية (c) . ليجيز DNA يثبت التركيب عن طريق تكملة هيكل السكر بالجزىء .

تحليل القواعد فى الدنا – الأجروز جيل الكتروفوريسيز

يستخدم الفرد الكهربى الجيلاتينى للأجاروز على نطاق واسع كوسيلة تحليل للقواعد لتمييز جزئيات " الدنا DNA " . هذا التكنيك يفصل بشكل فعال عمق قطع "الدنا" فى مخلوط عديم التجانس على أساس حجم الجزىء حيث أن القطع الصغيرة فى "الدنا" تهاجر خلال مادة الجيل أسرع من القطع الكبيرة تحت تأثير التيار الكهربى (جزئيات الدنا ذات شحنة صافية سالبة وتهاجر فى اتجاه الأنود) . تعتمد معدلات الهجرة على توجيه وتناسق "الدنا" حيث أن الجزئيات المستقيمة خطيا تهاجر ببطىء اكثر عن الجزيئات الحلقية التى لها نفس طول النيوكلوتيد . بالإضافة الى ذلك فان الجزيئات الحلقية يمكن أن تتطور وتتحور الى ما يعرف بالملف السوبر supercoiled المنضغط والملفوف ومن ثم يستطيع الهجرة بسرعة أكبر خلال مادة الجيل .

الجيل اليكتروفوريسيز يتضمن تحميل عينة صغيرة من مخلوط الدنا غير المتجانس (ناتج هضم اندونيوكليز التقييد كمثال) فى حفرة فى الجيل (الشكل ١-٦) . بعد ذلك يتعرض لتيار كهربى فى خزان أفقى أو رأسى من خلال محلول منظم أيونى ما بين ١٠ دقائق وساعات عديدة اعتمادا على تركيز الأجاروز وحجم الجيل والفولت المستخدم والتناسق فى الدنا . الكتروفوريسيز التقطيع الذى يهضم جزئيات الدنا البسيطة نسبيا يحقق فصل الحزم للدنا التى تظهر مع الصبغ بصبغة الفلورسنت فوق البنفسجية مثل إيثيديوم بروميد التى تدفن

فى الجيل مع المحلول المنظم ٠,٥ ميكروجرام / ملليلتر (فى المقابل وكبديل يمكن صبغ الدنا بعد عملية الالكتروفوريسيز عن طريق تحضين الجيل فى تنك به منظم خارج يحتوى على الصبغة) . بعد الصبغ يتعرض الجيل للأشعة فوق البنفسجية متوسطة المدى (٣٠٠ نانوميتر) باستخدام الكشاف الضوئى . يحدث توهج لحزم الدنا الفلوريسنية ومن ثم يمكن تصويرها من خلال مرشح مناسب باستخدام فيلم البولارويد . الحجم الجزيئى لانشطارات الدنا يمكن تقديرها من خلال مقارنة هجرة الحزم مع الحجوم القياسية المفصولة على نفس الجيل .



شكل (١-٦) : صورة بولارويدية للأجاروز جيل المصبوغ بالاثيديوم بروميد بعد عملية الفرد الكهربى للدنا المهضوم الخاص بالتقييد (تركيز العينة المحملة فى الجيل تتراوح من ١٠ – ٥٠٠ نانوجرام ، حجم الجزيئات يتراوح من ٢٣٠٠ (القمة الى ١٠٠ bp القاع) .

أنواع " الدنا DNA " الموجود فى الكائنات الحية

لا غضاضة فى مزيد من التوضيح :

أ – الدنا النووى : الغالبية العظمى من الدنا فى الكائنات الأولية eukaryotic والدنا الجينومى وجدت فى النواة حيث توجد بنسبة كبيرة فى تتابعات خطية مملة رتيبة . من المثير للدهشة أن أقل من ١٠% من هذا الحامض النووى هو الذى يترجم تاركا ٩٠% على الأقل من الجينوم فائض عن الحاجة . فى الكائنات عديدة الخلايا فان كثير من الدنا المتوفر

غير المشفرة تمثل مناطق تكرار ومتابعة " مثل القمر الصناعى " (منـاطق يحـدث فيـها سلاسل من التتابعات المتميزة للنيكلوتيد المتميز) والذى قد يوجد على موقع واحد أو اكـثر خلال الجينوم . هذه المناطق ليست لها وظائف واضحة التتابعات التكرارية الأخرى يطلـق عليها " تكرارات منتشرة والتى تنتشر داخليا interspersed تتوزع بشكل عريض كنسـخ فردية خلال الجينوم وتستنسخ ويكون لها أدوار تنظيميـة أو تركيبيـة . معظـم الجينـات المستنسخة عبارة عن تتابعات فردية طبق الأصل بالرغم من أنه ليس كل نسخ الدنا الفردية تستنسخ .

عزل الدنا النووى : مستخلصات الحمض النووى الكلى من الأنسجة الطازجـة او المجمدة أو المحبة للدهون تحتوى على نسبة كبيرة من الحمض النووى "دنا" . بعد ترسـيب البروتين بالفينول و/أو الكلوروفورم فان المعاملة بانزيم البروتينيز قد يكون ضرورى لإزالة الآثار النهائية للبروتين . بعد الترسيب ومعادة التعلق فان المعاملة بانزيم Rnase قد تستخدم للتخلص من أى مرافق دنا مترسب .

ب- الدنا العضوى Organellar DNA : معظم بروتينات أعضاء الجسم تشـفر بالجينات النووية تخلق فى السيتوبلازم وتصدر الى الأعضـاء . مـع ذلـك فـان بعـض البروتينات العضوية وكل الدنا الخاص بالأعضاء تشفر بواسطة الدنا العضوى وتخلق داخل العضو . جينوم الميتوكوندريا ذات تنوع استثنائى خاصة فى الحجم . فى الواقع فانـه قـد توجد اختلافات حجمية كبيرة داخل النوع وبين الأنواع . جينوم الميتوكوندريا النباتية بوجـه عام تتكون من العديد من الشرائط المزدوجة الدائرية و/أو المستقيمة من جزئيـات "الدنـا". شكل (١-٧) والتى يمكن أن تندمج مع بعضها البعض . فى المقابل وعلى عكس ذلك فـان جينومات البلاستيدات الخضراء عادة تتكون من طراز منفرد لجـزئ الشـريط المـزدوج الدائرى والذى يكون له نفس الحجم داخل أى نوع وذات أحجام متشابهة بين الأنواع . دائما توجد الجينومات العضوية فى نسخ متعددة فى داخل العضو .



شكل (١-٧) : اليكتروفوريسيز جيل الأجاروز لدنا الميتوكوندريا الأصيل المعزول مـن صنـف الأرز WULOA والذى يوضح عدد الجزئيات المماثلة للبلازميد . الخطـوط المعلمـة M = معلمات حجم الدنا - من اليسار الـى اليميـن ٢٣٦٧ ، ٩٤٦ ، ٦٦٦ ، ٤٢٦ ، ٢٣٠ ، ١٩٦ bp .

عزل " دنا " DNA الميتوكوندريا والكلوروبلاست : يمكن تحقيق هذا العزل بسهولة عن طريق تجهيز عضيات من خلال هرس النسيج وعمل كريات اختيارية من العضيات بواسطة الطرد المركزى مع محلول متدرج من السكروز البسيط . بعد ذلك تعامل العضيات بانزيم Dnase لازالة الدنا النووى ثم يغسل ويحلل بمعاملة انزيم البروتينيز . يتم ترسيب الدنا المنفرد بالطريق العادى .

دنا البلازميد

البلازميدات عبارة عن جزئيات دنا بسيطة تكون منتظمة فى العادة ذات شرائط مزدوجة حلقية . فى البكتريا وحيث أن هذه الجزئيات تفصل من الجينوم الرئيسى فأنها تحتوى فى الغالب على جينات تحقق أو مسئولة عن صفات بكتيرية هامة مثل المقاومة للمضادات الحيوية . بسبب حجمها الصغير يكون من السهولة توصيف البلازميدات واكثارها . بسبب صفاتها الخاصة أصبحت البلازميدات البكتيرية من الوسائل الهامة فى تكنولوجيا اعادة الدمج لأنها تمثل ناقلات مناسبة للمعلومات الوراثية .

عزل دنا البلازميد : يتضمن ذلك اكثار متخصص لخلايا البكتريا فى وسط سائلى يتلوه التحلل ثم فقد البروتينية والترسيب . يتم صبغ الدنا الكلى التى جهزت بمركب ايثيديوم بروميد وتعريضها للطرد المركزى الدقيق فى محلول متدرج التركيز من كلوريد السيزيوم . مكون البلازميد الزائد الذى يظهر فى ضوء الأشعة فوق البنفسجية يمكن تنقيطه بشكل متخصص من أنابيب الطرد المركزى .

تركيب الحامض النووى RNA " رنا "

التركيب الأساسى للحمض النووى ريبونيوكليك (RNA) شديد التشابه مع الحامض "دنا DNA" ولكن يوجد اختلافان رئيسيان : هيكل سكر جزىء الرنا يتكون من الريبوز بدلا من ديوكسى ريبوز فى الدنا كما أن القاعدة العضوية ثيامين حل محلها البيريميدين واليوراسيل . يمكن ان يوجد " الرنا " على شكل جزئيات فردية أو مزدوجة الشرائط ومن الأهمية ملاحظة أن الأول قد يهجن مع الدنا وحيد الشريط لكى يتكون إهليج هجين ثنائى الشريط دنا : رنا . وجد أن الحمض النووى "رنا" شديد التنوعية من حيث التركيب والوظيفة ولكن الصور الثلاثة الأساسية له تتعاون وتشارك فى عملية تخليق البروتين . الدنا الرسول " mRNA " يستنسخ كنسخة وحيدة الشريط من شرائط الدنا الجينومية على نسق ونظام التحور المعقد لما بعد الاستنساخ فى الكائنات الدنيئة حاملا الرسالة الوراثية الموجودة فى السيتوبلازم إلى الريبوسومات الذى يملك " رنا ريبوسومى rRNA " كأحد مكونات التركيب . لذلك فان الرنا المسافر "tRNA" بجزئياته ذات

التركيب الثانى المتخصص ينقل ويترجم الشفرة النيوكليتدية مما يدخل الأحماض الأمينية فى الببتيد الحديد النامى .

التحور اللاحق للاستنساخ لناسخ الرنا الأولى : لقد لوحظ أن النسخ الأولى "للرنا" يمثل نسخة مكملة من صفائح الدنا ولكنها تزيد بعشرة مرات فى الطول عن mRNA . التحور اللاحق للاستنساخ يتضمن فى الأساس إزالة التداخل المتتابع " الانترونات " من الناسخ الأولى فى عملية يطلق عليها الوصل أو الزواج “splicing” . هذه العملية لاتحدث فى الكائنات الأولية وهذا يعنى أن الجينات غير الموصلة فى الكائنات الأولية لاتستطيع أن تعبر عن نفسها بشكل صحيح فى البكتريا المندمجة .

عزل " الرنا " : يجب على الباحث الحذر والعناية عند العمل على الرنا العارى لأنه غير ثابت بشكل كبير . قد يستدعى الأمر تحوير المحلول المنظم الخاص بالاستخلاص عن طريق إضافة مثبطات النيوكليز و/أو مواد تكون معقدات ثابتة مع " الرنا " . فى الغالب يتم تجهيز الجواهر الكشافة باستخدام الماء المحتوى على داى ايثيل بيروكربونات (DEPC) وهو مثبط فعال لانزيم النيوكلييز . يمكن ترسيب " الرنا " من تجهيزات الأحماض النووية الكلية باستخدام الايثانول فى وجود ملح (مثل كلوريد الليثيوم) ثم يجرى هضم لمرافق الدنا المترسب من الكريات المعلقة مع Dnase خالى من Rnase . فى بعض الأحيان يتجنب استخدام محاليل الفينول باستخدام العواميد / الأغشية لتنقية المستخلص الخام .

طرق تحليل أخرى للأحماض النووية

قبل أن استطرد فى طرق تحليل الأحماض النووية لمعرفة مكونات السلاسل الخاصة بها ونظام التتابع وإمكانيات دمج المكونات التى تم تفكيكها مرة أخرى ومعرفة نظام نقل الشفرات والاستنساخ أود التذكرة ببعض المعلومات الأساسية والتى قد تكون وردت ضمنا فى الأجزاء السابقة . أذكر بالنموذج الذى اقترحه الباحثان واتسون وكرك عام ١٩٥٣ والخاص بشكل "الدنا" وذكر أن الحمض النووى "دنا" ما هو إلا حلزون مزدوج يحتوى على سلسلتين بكل منهما عدة نيوكليتيدات كل منها تسير فى اتجاه عكس للأخر . سبق الإشارة الى أنه إذا كان الشريط الأول فى اتجاه (٣-٥) فان السلسلة المقابلة فى الشريط الثانى تكون فى اتجاه (٥-٣) . أساس التحليل مبنى على الشريطان ممسوكتان برابطة ايدروجينية ضعيفة تزول بالتسخين . حيث تم معرفة خاصية تزاوج القواعد أصبح فى الإمكان معرفة تتابع أو تعاقب هذه القواعد على طول شريط " الدنا " . فك الروابط الايدروجينية بالتسخين وما يستتبع ذلك من فصل السلسلة يسمى Denaturation ويمكن إعادة السلسلة مرة أخرى بالتبريد لحالتها الأولى Annealing أما كيف يكرر "الدنا" نفسه داخل الخلايا أثناء الانقسام

يمكن فهمها عن طريق نظرية تزاوج القواعد كما فى (A) مع (T) وكذلك C مع G حيث تتم عملية الانفصال والتكامل معا فى وقت واحد Complementary .

لقد سبق الإشارة الى أن الخلية الحية بها ثلاثة انزيمات تشترك فى عمليات تكرار الحامض النووى وهى ليجيز ، ونابوليميريز ، توبو أيزوميريز . لقد تأكد ذلك من وجود شريط الأب مع شريط جديد للابن فى خلية واحدة مع نفس تعاقب القواعد فى جزىء "الدنا" الأصلى . لقد برز تساؤل : هل الرسالة الوراثية "للدنا" مكتوبة بأربعة حروف أبجدية تمثل الأربعة قواعد للأحماض الأمينية A-T-G-C ؟ نعم هم أربعة قواعد سيتوسين ، جوانين ، ثيامين ، أرجينين . لذلك تعنى أى طفرة تغيير فى تتابع هذه القواعد أيا كانت صور التغيير. كذلك فان طفرة فى تركيب البروتين تعنى تغير فى تعاقب الأحماض الأمينية فيه .

لكى أقرب للقارىء أهمية الحمض النووى "رنا RNA" أقول ان المعلومات الوراثية فى الدنا من جراء تعاقب النيوكليتدات لابد أن تنتقل الى جزىء وسيط هو الذى يتحرك الى السيتوبلازم ليعطى الأوامر الخاصة بتكوين الأحماض الأمينية . هذا الوسيط هو الحمض النووى " رنا" . يا سبحان الله توصل العلماء الى أن العلاقة الخاصة بتكوين البروتين على النحو التالى : تضاعف = دنا – رنا – بروتين . ثم النسخ ثم الترجمة . مطلوب شريط واحد من "الدنا" يعمل كفورمة لتكرار نفسه أو يتكامل مع نفسه أو عمل جزىء ... الرنا RNA تكمل له النسخ والذى يعمل كفورمة تصدر الأمر بتكوين الحنض النووى الداخل مع سلسلة ببتيدات البروتين . يطلق على مجموعة النيوكليوتيد المبرمجة ألكودون ويتكون كل منها من ثلاثة قواعد نتروجينية . الانزيمات ذات دور كبير وضرورى فى تكوين " الدنا" مثل الدنا بوليميريز .

سوف أشير سريعا الى بعض الطرق الخاصة بتحليل الأحماض النووية . الأولى تشمل طرق التعليم او البصمة Blotting methods ومنها طريقة ساوثرن Southern polt وفيها يتم نقل شرائح " الدنا " التى سبق فصلها بواسطة الفرد الكهربى على الجيل الى غشاء نيلون أو نيتروسليلوز للحصول على طبعة أو بصمة الجيل (Southern ، ١٩٧٥). هناك طريقة البصمة نورثرن northern plot حيث يمكن تحليل مخاليط غير متجانسة من جزئيات "الرنا" بالفرد الكهربى بالإضافة الى النقل الى غشاء (عادة يكون نشط كيميائيا) كورقة معاملة الداى آزور بنزيلوكسى ميثيل بسبب أن "الرنا" لا يرتبط طبيعيا بالنيتروسليلوز يستخدم طريقة مماثلة للبصمة السوثرنية تسمى البصمة النورثرنية (Alwine وآخرون ، ١٩٧٩) . بعد نقل البصمة يمكن تحفيز التهجين مع شريط الرنا أو الدنا المعلم إشعاعيا فى طريقة عادية . تجدر ملاحظة وجود طريقة مماثلة تسمى " البصمة الوسترنية Western

blotting للبروتينات (Burnete ، ١٩٨١) . يمكن فصل مخاليط البروتين بالفرد الكهربى على الجيل وتنقل الى غشاء النيتروسليلوز . الجزئيات الخاصة يمكن كشفها إذا توفرت أجسام مضادة غير متجانسة السلسلة باستخدام طريقة الجسم المضاد المزدوج . الجسم المضاد الخاص الذى يمكن أن يترتبط بالبروتين محل الاهتمام يعاود مرة أخرى الارتباط بالجسم المضاد الثانى الذى قد يكون معلم إشعاعيا أو من خلال تفاعل فلوريسينى مع الوسيط . من البدائل السريعة الفصل الكهربى والذى يتضمن نقل كهربى للجزيئات من الجيل الى مرشح نيتروسليلوز أو غشاء نيلون أو الرضع بالشفط أو التفريغ وهذه يمكن أن تستخدم مع البروتينات والأحماض النووية .

تعاقب قواعد " الدنا " DNA sequencing : تتابع النيوكليتدات فى القطع الصغيرة من "الدنا" يقدر عادة بطريقة سانجر والمعروفة كذلك بطريقة الداى ديوكسى أو طريقة نهاية السلسلة (Sarger وآخرون ، ١٩٧٧) . تقوم هذه بتقدير التتابع فى شريط مفرد من "الدنا" لأن عملية التتابع تتضمن تخليق انزيمى لشريط ثانى أو مكمل باستخدام الشريط الأصلى "للدنا" كفورمة أو اصطمبة كما سماها أ.د. زيدان السيد عبد العال فى كتابه "التكنولوجيا الحيوية وآفاق القرن الحادى والعشرين" . فى هذه العملية يكون من الضرورى ربط الشريط محل التتابع فى بلازميد متميز موصف والذى قد يوجد طبيعيا كجزىء مشرط منفرد أو مفصول قبل التتابع . إن الادخال فى البلازميد يسمح بالتضاعف فى الخلايا البكتيرية ويحدث مناطق كشح على نهايات التتابع المستهدف . (البلازميد عبارة عن كروموسوم متناهى فى الصغر لا يتصل بالكروموسوم الأصلى الكبير الموجود فى البكتريا – يحمل البلازميد عدة عوامل وراثية مسئولة عن المقاومة للمضادات الحيوية – بسبب حاجة هذه المضادات الى الانزيمات لمعادلة تأثيرها فان هذه الانزيمات تعمل على تكرار أو تكاثر البلازميد) .

انزيم الدنابوليميريز الذى يساعد فى تخليق الشريط المكمل على الاصطمبة يتطلب منطقة مزدوجة الشرائط منها لبدء تخليق شرائط لاحقة . لذلك فان الخطوة الأولى فى تتابع قطعة الرنا وحيدة الشريط تتمثل فى السماح لطول صغير أو مكمل للدنا " بادىء primer" للتهجين فى تتابع معروف عند نهاية واحدة من الاصطمبة . هذا يحقق منطقة ثنائية الشرائط قصيرة ومنها يمكن لانزيم بوليمراز الرنا بداية دوره وعمله . تخليق الشريط المكمل يحتاج فى تفاعله الى أربعة أنابيب تفاعل منفصلة كل منها يحتوى على :

١-الاصطمبة مع بادىء مرتبط.

٢-كل النيوكليتيدات الأربعة . تقدم هذه فى صورة ديوكسى نيوكليوسيد تراى فوسفات حيث يتم فيها الدفن فى شريط الدنا المتنامى وتعلم إشعاعيا بالكبريت المشع " كب ٣٥ " والذى يساعد لاحقا فى عملية التتابع :

ديوكسى ادينوزين تراى فوسفات d ATP > أدينين .

ديوكسى جوانوسين تراى فوسفات d GTP > جوانين .

ديوكسى ثيامين تراى فوسفات d CTP > سيتوسين .

ديوكسى ثيامين تراى فوسفات D TTP > ثيامين .

٣- انزيم الدنا بوليميريز الذى يساعد التفاعل .

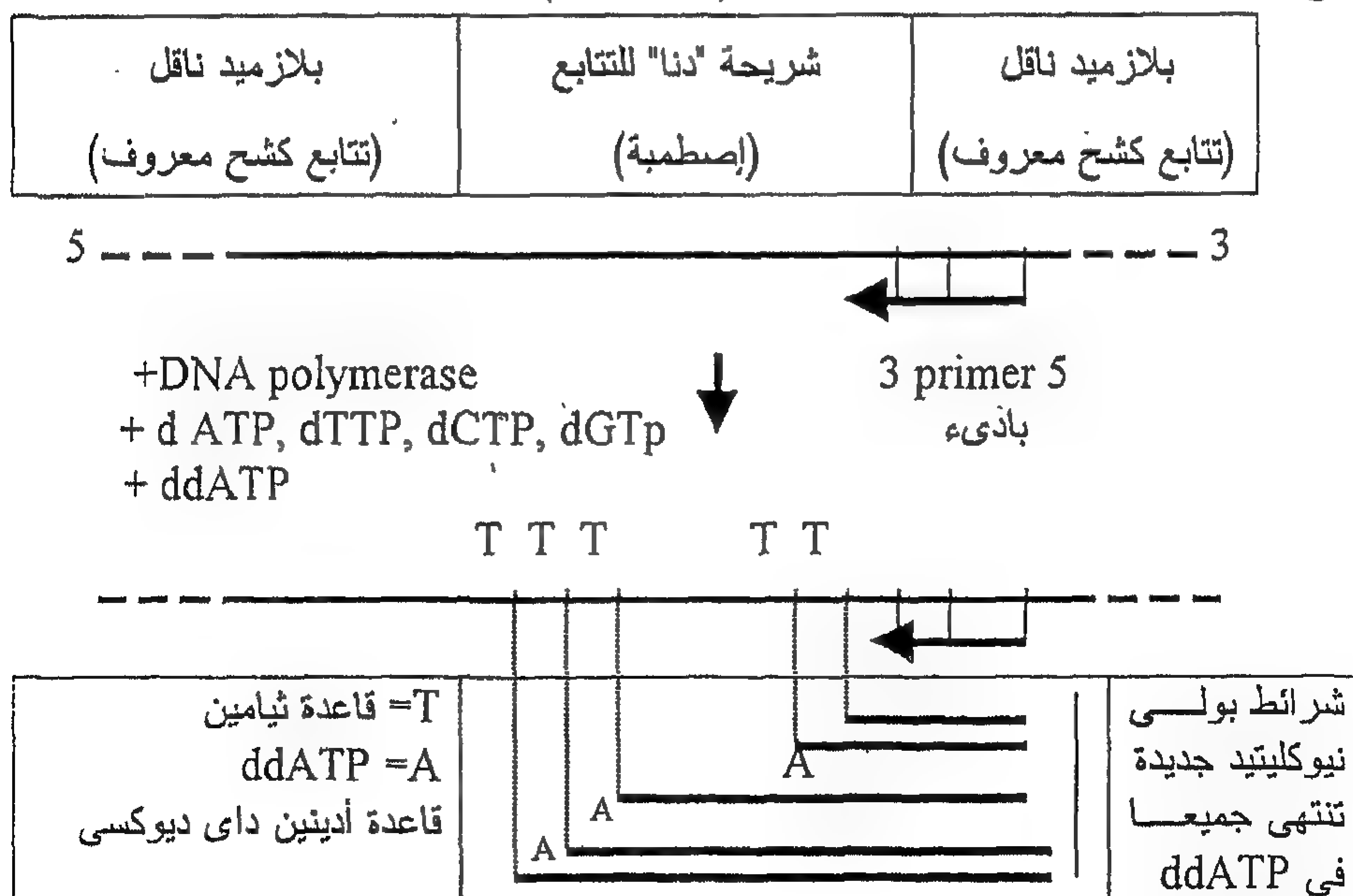
بالإضافة الى ذلك فان الأربعة أنابيب تحتوى واحد من الأربعة نيوكليتيدات المختلفة والمحورة وهى : داى ديوكسى نيوكلوسيد تراى فوسفات , ddTTP , ddCTP , ddGTP . ddATP

لقد أمكن بهذه الطريقة وغيرها من التعرف على تتابع أو تعاقب القواعد لأكثر من عشرة آلاف زوج من القواعد لقطعة "دنا" مناسبة الحجم . قد يسأل البعض ماذا يعنى معرفة التتابع فى القواعد لأى "دنا" ؟ نقول أن هذا هو المفتاح وبيت القصيد لأية نجاحات تكنولوجية حيوية للحصول على منتجات أو أحياء معدلة وراثيا لصالح الإنسان وحماية للبيئة . بالرغم من القفزة الهائلة التى حدثت فى الكشف عن تتابعات القواعد والأحماض الأمينية والنيوكليتيدات إلا أن البحاث يسابقون الزمن فى الكشف عن طرق أسهل وأسرع لتحقيق هذه الأهداف . لنا أن نتصور ما سوف يحدث من أدوار هائلة للهندسة الوراثية فى تقدم البشرية ورفاهيتها .

فى الوقت الراهن يستخدم الحاسوب الآلى فى دراسة نظام تعاقب قواعد "الرنا" حيث تقوم الشركات بتركيب البادىء و"الرنا" صناعيا ووضع القواعد عليهما بالعدد والنظام المرغوب فيه . الأجهزة فى تطور يكاد يكون يومى حيث يستخدم الآن انزيم محسن هو (تى سبعة – T7) أو سيكوينيز للحصول على تعاقب واضح بمعدل ٣٠٠ قاعدة فى الثانية الواحدة . توجد الآن أجهزة تستطيع القيام بدراسة التتابع بمعدل ٥٠٠ قاعدة فى الساعة ، ٧٢٠٠ قاعدة فى الساعة ، ٦٤٠٠٠ قاعدة فى ساعتين كما ذكر أ.د. زيدان السيد عبد العال لقد أضاف سيادته أنه يوجد فى الأسواق قطعة شبس حجمها ٢,٥ سم عليها الحمض "دنا" به قواعد ونظير مشع يمكن أن يهجن مع "دنا" غير معروف تابع قواعده ثم يوضع فى الحاسب الآلى للتعرف على تتابعات القواعد النتروجينية لذلك المجهول . يتكلف التعرف على قاعدة

واحدة من ٥ – ١٠ دولار فإذا علمنا أن الإنسان ٣ مليار زوج من القواعد النتيروجينية لاتكون هناك غرابة فى المليارات التى تكلفها البرنامج الدولى لرسم الخريطة الوراثية للإنسان " الجينوم " .

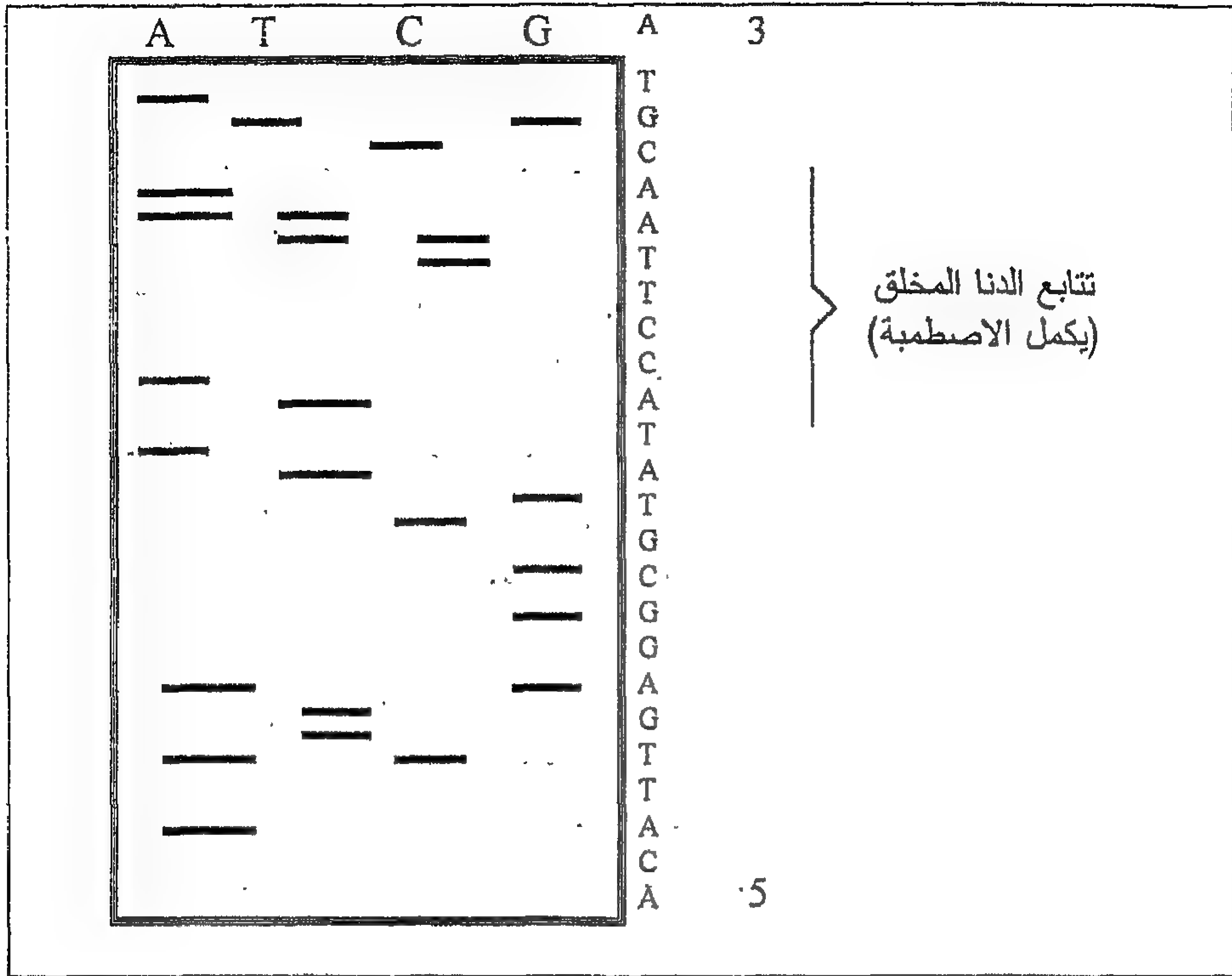
تخليق شريط " الدنا " المكمل Complementary DNA strand : مع تقدم التفاعل فان الدايوكسى نيوكلوسيدات (d ATP , d GTP) تدمج تباعا فى شريط "الدنا" النامى والذى يتكامل مع الفورمة أو الاصطمبة template . حيث أن الداى ديوكسى نيوكلوسيدش المحور يوجد فى كل وعاء (dd ATP , dd GTP ... الخ) فان له فرصة مساوية للدمج فى شريط الدنا النامى كما فى الصورة المرتبطة به من الدايوكسى نيوكلوسيد. عندما يحدث ذلك يقف تخليق أى شريط لاصق (بسبب الطبيعة الكيميائية لجزىء الداى ديوكسى نيوكلوسيد) . لذلك فانه فى وعاء التفاعل الذى يحتوى على d ATP , dd ATP (والدايوكسى نيوكلوسيدات الأخرى) فانه يتم انتاج مجموعة كلية من الشرائط المكملة ذات أطوال مختلفة اعتمادا على المكان الذي حدث فيه دمج للـ dd ATP بدلا من d ATP . هذا يحدث فى كل أوعية التفاعل ومن ثم ينتج أربعة مجاميع من الشرائط التى أوقفت . تحتوى مجموعة واحدة على شرائط ذات أطوال مختلفة كلها تنتهى فى dd ATP وواحد مع شرائط تنتهى فى dd GTP الى آخره (شكل ١-٨) .



شكل (١-٨) : تخليق شرائط "الدنا" للتكامل مع الاصطمبة فى وعاء التفاعل ddATP . نفس التخليق يحدث فى أوعية التفاعلات الثلاثة الأخرى .

مقارنة أطوال شرائط الدنا المنتهية بالفرد الكهربى على الجيل : شرائط الدنا جديدة التخليق في كل مجموعة تفقد طبيعتها لفصلها عن جزئيات الاصطمبة template ويتم تقدير أطوالها بالجيل مع الفرد الكهربى . مع هذه العملية الخاصة يكون من الضرورى العناية الفائقة بعملية الفرد الكهربى مع تحكم شديد بسبب ضرورية فصل شرائط تختلف فى الطول بينوكلوتيد منفرد . يتم تشكيل الجيل الرقيق المستخدم (٠،٥ ملليمتر) باستخدام البولى اكريل أميد ذو المقدرة على تحقيق فصل أفضل بكثير عن الأجاروز كما يحتوى على اليوريا التى تمسك الدنا فى الحالة القابلة للفصل أو المفصولة . العينات من كل من الأربعة أوعية للتفاعل يتم تعرضها لعملية الفرد الكهربى فى أربعة ممرات جنبا الى جنب ثم يتم تعليم القواعد A,T,G أو C تبعا لأى منهم يتم إضافة قاعدة الدايويوكس . الحزم الناتجة تحتوى على كميات صغيرة جدا من " الدنا " ولكن يمكن الكشف عنها وتحديدها بالأشعة الذائبة autoradiography . هذه العملية الحساسة تكشف عن الفوسفور ٣٢ الذى سبق إدخاله فى واحد أو أكثر من القواعد .

قراءة تتابع " الدنا " من وحدة قياس الإشعاع الذاتى : الحزمة التى تحركت أبعد على الجيل تحدد . هذه تمثل أصغر شريط يمكن تقديره من " الدنا " الناتج أى الشريط الذى انتهى من جراء دمج قاعدة الدى ديوكسى عند واحد من المواضع الأولى القليلة على الاصطمبة. يتم ملاحظة الممر الذى حدثت فيه هذه الحزمة . إذا كانت فى الممر المعلم (A) فان القاعدة الأولى التى تم الكشف عنها فى التتابع تكون (A) . الحزمة الثانية فى الصغر تحدد . هذه ترتبط أو تقابل شريط " الدنا " الذى به يكون قاعدة واحدة أطول من السابقة . يتم تحديد الممر الذى حدثت فيه . إذا كان الممر T كمثال تكون القاعدة التالية فى التتابع T . تستمر هذه العملية فى جهاز قياس الإشعاع الذاتى (شكل ١-٩) . تجدر ملاحظة أن النيوكليتيدات القليلة الأولى التى تتأبعت تمثل منطقة الكسح للتتابع المستهدف . التتابع المتحصل عليه من جهاز قياس الإشعاع الذاتى يكون مكملا لما هو موجود فى الاصطمبة ولكن كلا الشريطين فى الجزىء المستهدف ثنائى الشرائط تتابعت .



شكل (١-٩) : تمثيل قياس الإشعاع الذاتى . كل ممر يحتوى على الشرائح الناتجة من تخليق الشريط المكمل فى واحد من الأربعة داى ديوكسى نيوكليسيدات . تتم قراءة التتابع بتعريف الممر الذى تقع فيه كل شريحة بداية بالشريحة التى حدث فيها هجرة بأكبر مسافة (واضح الفصل) ثم يتقدم فى اتجاه قمة الإشعاع ثم تتم القراءة للتتابع فى اتجاه ٥ ، ٣ .

تفاعل سلسلة البوليميريز polymerase chain reaction : (PcR)

يسمح تفاعل PcR بتضخيم خاص وسريع لقطعة " الدنا " ومن ثم سهولة الكشف عن تتابعات مختارة من " الدنا " توجد فى كميات صغيرة للغاية فى مخاليط معقدة من الأحماض النووية . هذه الوسيلة الفعالة والقوية فى البيولوجيا الجزيئية الحديثة طورت فى الثمانينيات (Saiki وآخرون ، ١٩٨٥ ، Mullis and Faloona ، ١٩٨٥) وقد أجريت هذه الطريقة مع اتباع الأساسيات التالية :

١-يتم تكسير محلول من اصطمبة الدنا ثنائية الأشرطة المحتوية على التتابع المطلوب نسخه (التتابع المستهدف) عن طريق التحضين على درجة ٩٥ م تقريبا .

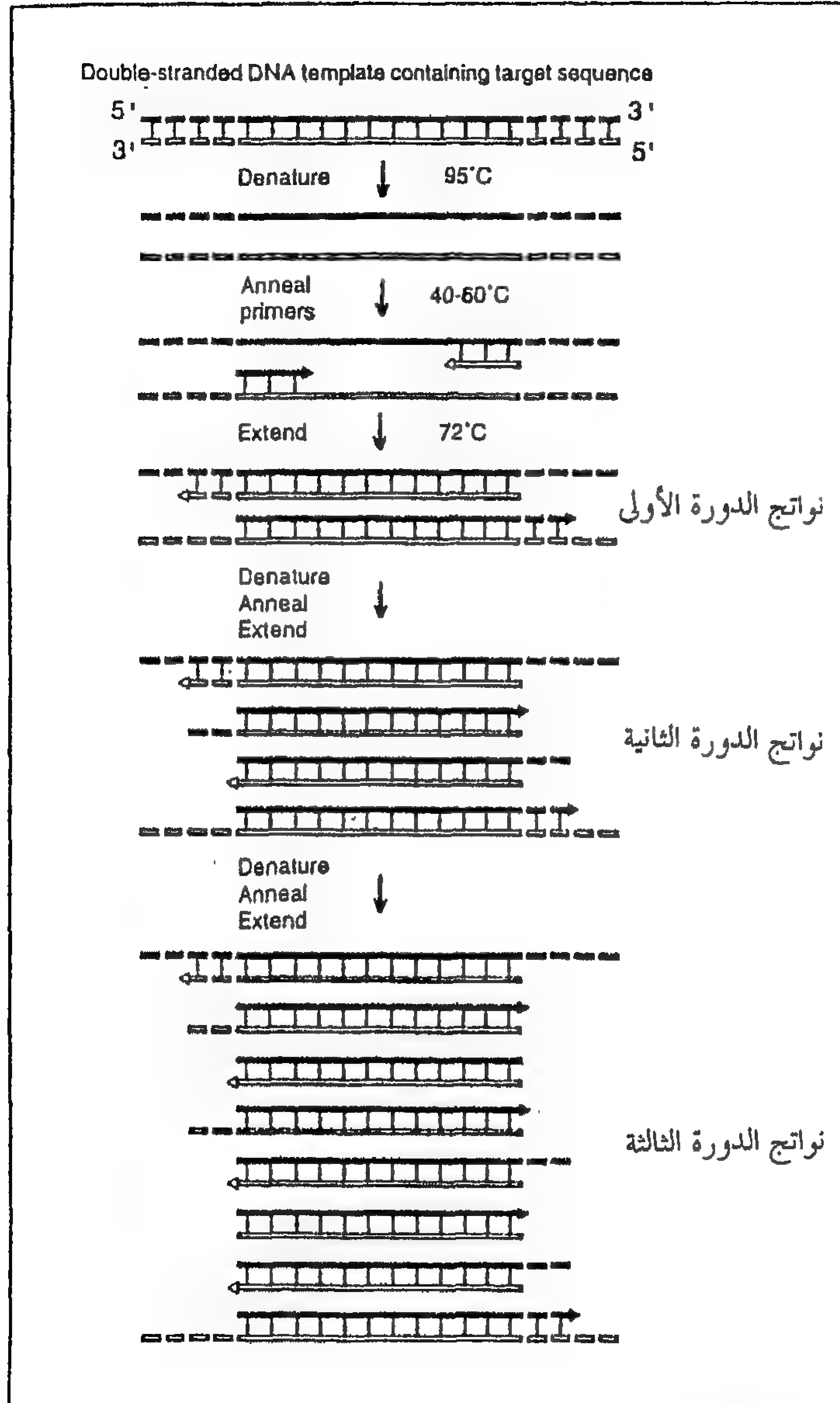
٢-زوج من البادئات محدودة النيوكليتيدات المصممة لتكثيف أو الإحاطة بالتتابع المستهدف يعاد لحالته الأولى من خلال التهجين المكمل للاصطمبة بالتحضين على ٤٠ - ٦٠ م .

٣-البادئات تمتد عبر التتابع المستهدف بفعل انزيم دنا بوليميريز الذى يحفز لدمج نيوكليتيدات حرة فى الشريط النامى بالتحضين على ٧٢ م (شكل ١-١٠) .

مع كفاية التزويد بالبادئات فان النيوكليتيدات وبوليميريز الدنا ذات الثبات الخاص للحرارة والتى تحتفظ بنشاط كبير بالرغم من تكرار التسخين حتى ٩٥ م (بوليميريز Taq) فان العمليات التى ذكرت أعلاه من فصل السلسلة فان إعادتها للحالة الأولى للبادىء وتقدم أو امتداد البادىء يمكن أن تجرى فى دورات متكررة . حيث أن الأشرطة المنسوخة لدورة واحدة كمثال للمركبات التى تعمل كاصطمبات للدورة التالية فانه مع كل دورة تالية يكون من الضرورى مضاعفة كمية التتابع المستهدف الناتج . استخدام بوليميريز الدنا ثابت الحرارة والذى يمكن إضافته بكميات زائدة فى الوعاء مع المكونات الأخرى عند بداية التفاعل تسمح بجعل العملية كلها آلية من خلال استخدام برنامج التحكم فى الحرارة من خلال التسخين أو دوار الحرارة .

تقنية تفاعل سلسلة البوليميريز PcR

عندما يستخدم الدنا الجينومى كاصطمبة PcR تعتبر الدورات الابتدائية بمثابة مرحلة اختبارات تمييز Screening phase حيث أن التتابع المستهدف يختار للتكبير اللاحق (شكل ١-١٠) . البادئات توجه بلمرة الدنا عبر التتابع المستهدف وما وراءه فان طول الناتج المخلق يكون محدودا مع الوقت . فى الدورات المتتابعة فان النواتج الجديدة المخلقة تمثل الاصطمبة المنفصلة حيث أن هذه الاصطمبات توجد بزيادة فى الدنا الجينومى. على عكس الدنا الجينومى فان هذه الاصطمبات تكون شرائح متخمة تتضاعف وتكبر فى الدورات السابقة ويمكن تعريفها عن طريق تخصص البادئين فى التهجين على مواقع أو تكملة شريط الدنا . يعتمد التخصص فى التكبير على ثبات عملية التهجين . لذلك فان ظروف التهجين يجب أن تكون مضبوطة تماما (هذا يعتمد على حرارة التحضين وتركيز أيون الماغنسيوم وكلاهما تؤثر على التهجين) خاصة فى الدورات المبكرة حيث الدنا الجينومى الذى يملك العديد من المواقع المماثلة لمواقع التهجين تكون الاصطمبة .



شكل (١-١٠) : الدورات الثلاثة الأولى للـ PcR . الخطوط المصمتة فى داخل اصطمبة الدنا تمثـل التتابع المستهدف ، المناطق تحت التتابع المستهدف تمثل بالخطوط المتقطعة . الشرائط السوداء والبيضاء للدنا يكمل بعضها الآخر : ورؤوس الأسهم توضح اتجاه البلمرة .

تحليل نواتج سلسلة البوليميريز PcR

الناتج المطلوب فى تفاعل PcR غالبا ما يكون من نوع القطع المكبرة والتى يمكن تمييز وجودها فى مخلوط التفاعل بالفرد الكهربى لجيل الأجاروز والصبغ ببروميد الاثيديوم الأخيرة سوف تسمح بالحجم الفعلى للمنتج قابل للمقارنة مع الحجم المتوقع بناء على بيانات التتابع . يمكن استخدام طريقة البقع السوثرنية أو تحليل التتابع لتأكيد تعريف المنتج .

التكبير غير المتخصص

تكبير أنواع القطع قد ينتج بشكل ضخم تحت بعض الظروف . البادئات سيئة التصميم والتى لا يكون عندها تخصص كافى للتتابع المستهدف قد يؤدى الى نشاط عبورى. بالإضافة الى ذلك فان ظروف التفاعل غير المتخصص مثل درجة الحرارة تحت الملائمة لإعادة الشريط الى حالته الأولى قد يزيد من التكبير المتعدد للمنتج . قد ينتج البادىء – المزدوج "primer – dimer" نتيجة للتكامل والتهجين بين البادئات . جزئيات المزدوج الناتجة تتنافس على التكامل مع التتابع المستهدف وتتداخل مع الكشف عن المنتجات الصغيرة . يمكن تحقيق بعض التكبيرات المتخصصة فى بعض الأحيان عن طريق إعادة تكبير المنطقة الداخلية للمنتج غير المتخصص . هذا الاقتراب يمكن من التغلب على الصعوبات التى تجابه التكبير غير المتخصص لأنه يعطى الفرصة لتتابع المنتج الأول والذي سبق تكبيره باستخدام زوج معين من البادئات واستخدام هذا التتابع ومعلوماته مجموعة ثانية عالية التخصص من البادئات الشبكية .

فوائد تفاعل سلسلة البوليميريز

لقد أصبح تفاعل PcR وسيلة شائعة جدا فى البيولوجيا الجزيئية لأسباب عديدة . هذا التفاعل سريع وسهل الإجراء بالإضافة الى شدة التخصص . من أكبر المميزات والعيوب الشدة المتناهية للحساسية . من الناحية العملية فان الطريقة تكبر التتابع المستهدف تقريبا بمقدار $١٠^{٦}$ مرات فى ٣٠ دورة ولذلك فانه حتى مع النسخة الفردية للتتابع المستهدف يمكن الكشف عنها بعد عملية التكبير . من هنا يجب أن تكون كل الجواهر الكشافة والماصات والمواد المستهلكة خالية من التلوث بالدنا من التجارب السابقة أو من الجواهر الكشافة الموجبة فى عينات المقارنة لتجنب الحصول على نتائج موجبة مزيفة .

بعض استخدامات تفاعل سلسلة البوليميريز

لقد وجد أن التوسع أو التكبير من خلال تفاعل PcR له استخدامات متخصصة فى تحليل الطفرات . بادئات النيوكلوتيد المحدود ذو الالليل المتخصص (ASO) والتى فيها

تتابع كافى مشابه يمكنها من الارتباط على نفس الموقع المستهدف ولكنه مختلف بما فيه الكفاية (من خلال واحدة أو اكثر من القواعد) عما هو الحال مع ظروف التهجين عالية التخصص فأنها ترتبط فقط بالالليل الذى يتوافق تماما فى التتابع كمثال لما يحدث فى الطفرات المرضية . الاستخدامات الأخرى للـ PcR تتضمن الكشف عن تتابعات الحمض النووى فى الممرضات النباتية فى الأفراد المفترض عدواها قبل تطور الأعراض ، تحليل النباتات المنقولة ذات الشك فى مرضيتها للكشف عن وجود الجينات الغريبة وكذلك الكشف عن الكائنات الدقيقة المحورة وراثيا (GMM's) فى البيئة . علاوة على ذلك فإن جيل النسخ المتعدد لتتابعات دنا متخصص باستخدام تفاعل سلسلة البوليميريز (PcR) أصبحت الأن ذات أهمية فى طرق إعادة دمج " الدنا " فى المدى الواسع بما فيها إنتاج جسات الدنا "DNA probes" وإنتاج كميات كبيرة من الدنا للتتابع وتركيب دنا مكمل (cDNA) للتتابع من كميات صغيرة من mRNA وكلونة أو نسخ الجين . بعض من هذه الاستخدامات تم تسهيلها من خلال التطور الحديث الذى يسمح بكلونة نواتج تفاعل PcR مباشرة فى ناقلات البلازميد .

النسخ المتعاكس RT وتفاعل PcR

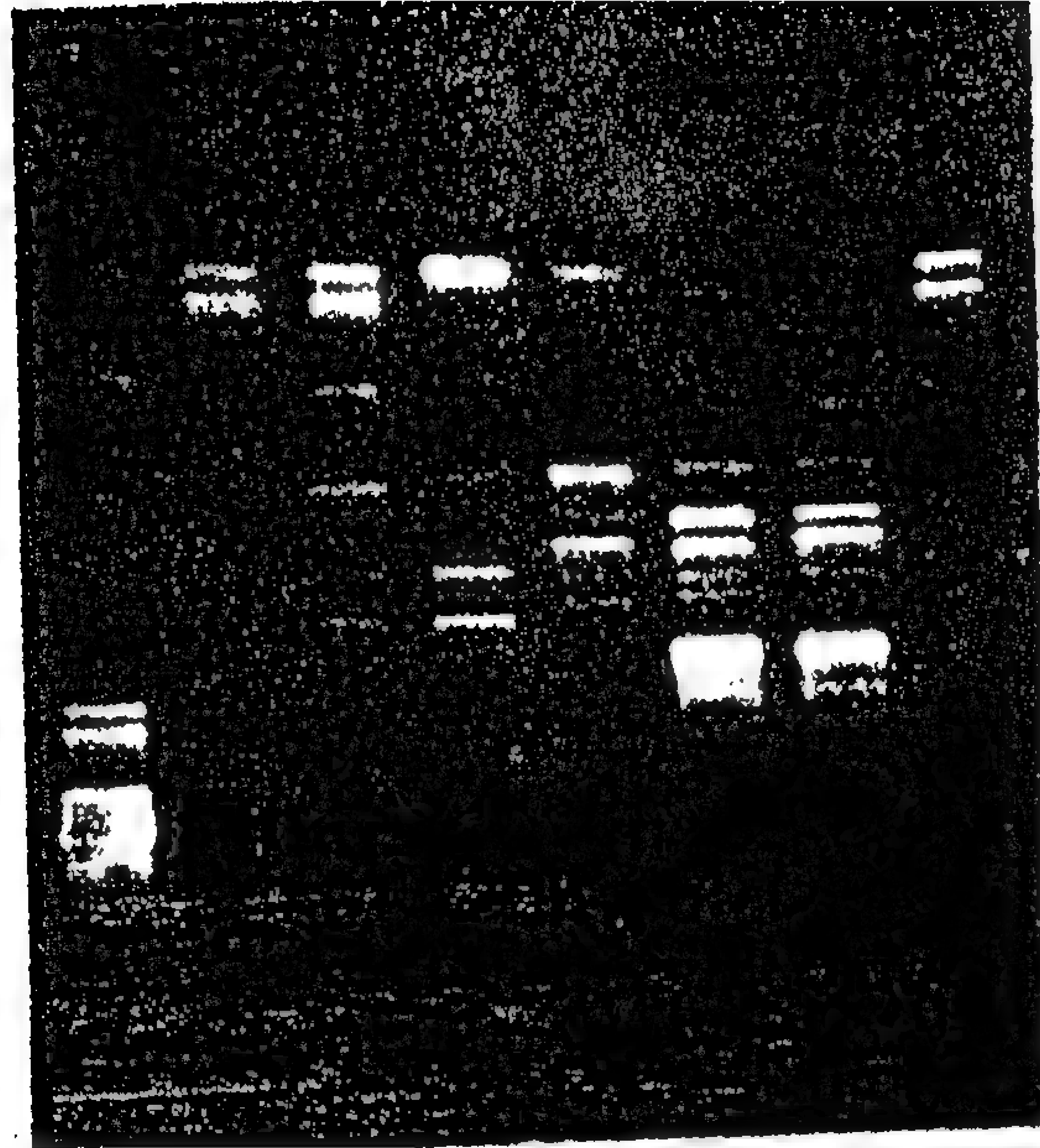
يمكن استخدام تفاعل سلسلة البوليميريز PcR مع الحامض النووى "رنا RNA " إذا كان يستنسخ فى cDNA قبل التكبير . يمكن تحقيق ذلك باستخدام النسخ المنفصل والمنقى العكسى ولو أن بوليمراز " الدنا " تملك نشاط نسخ عكسى بما يسمح بإجراء كل الخطوات فى وعاء تفاعل واحد . لقد ازداد استخدام طريقة RT-PcR فى النباتات لدراسة نواحى التعبير الجينى للكشف عن وجود الفيروسات المرضية للدنا .

التكبير العشوائى " للدنا " متعدد الأشكال

DNAs (RAPDs) Random amplification of polymorphic DNAc

لقد حدث الاستخدام المتطور للتفاعل PcR فى الجيل الخاص بالبصمات المعقدة "للدنا" والعلامات الجزيئية الجديدة . يجرى تفاعل PcR مع الاصطمبات الجينومية والبادىء المنفرد محدود النيوكلوتيد للتتابع التحكمى والذى يزيد من فرص انتاج مدى من القطع أو الشرائح المكبرة وبعضها يملك تعدد أشكال كبير فيما بين الأفراد (شكل ١-١١) . تقنية حدوث هذه العملية غير مفهومة جيدا ولكنها قد ترجع الى الحدوث بالصدفة فى (ربما) كل الجينومات الخاص بالتتابعات المتكررة المعكوسة ذات المسافة الداخلية مختلفة التكرار والتى تكون التتابع المستهدف بكفاءة حيث أن كل وحدة متكررة تعرف نهاية واحدة للمنتج من التفاعل PcR . إنتاج هذه البصمات يكون طريقة تحليل RAPD واتضح انها تفيد كثيرا

فى تعريف الطرز الوراثية فيما بين الأنواع المتخصصة . بالإضافة الى ذلك فان شـرائح RAPD تستخدم بزيادة كمعلمات جزيئية حيث هى قابلة للارتباط وقد تظهر صفات وراثية مشابهة . إن القابلية لتحديد وجود أو غياب خاصة فى بعض الأفـراد العلامـات RAPD المعروف ارتباطها بالصفات الفينولوجية محل الاهتمام قد تستخدم لاسراع وتحفيز برامـج التربية النباتية .



شكل (١-١١) : بصمات RAPD لسبعة طرز خارجية من Sinepis arvensis التى تكبر باستخدام بادىء عشوائى ١٠ مير . القناة اليمنى البعيدة تحتوى على معلمات حجم الدنا من أعلـى لأسفل ٣١٣٠ ، ٩٤١٦ ، ٦٥٥٧ ، ٤٣٦١ ، ٢٠٢٧ ، ٥٦٤ ، ١٢٥ bp

عمل خريطة الارتباط الجزيئية باستخدام التشكل المتعدد ذات الشـــرائح القاطعــة الطول كمعلمات (RFLP's) Restriction Fragment length polymoryhisms

إنتاج الخرائط الوراثية باستخدام المعلمات الجزيئية أصبحت فى غاية الأهمية فـــى العلوم النباتية . هذه الخرائط والطرق المستخدمة لانتاجها عديمة القيمة لدراسة التضـــاعف الداخلى للجينات الجديدة فى الأصناف النباتية وبذلك تعطى طريق لعزل وكلونـــة الجينـات السابقة غير الموصفة والتى تؤدى بعد ذلك الى إنتاج محاصيل تقـــاوم الضغــوط الحيويــة وغير الحيوية .

الارتباط الوراثى

الجينات التى يترافق وجودها على نفس الكروموسوم فى الكائن الحيى يطلق عليـــها "المرتبطة Linked " والجينومات تتكون من نفس عدد من أزواج الكروموسومات المتماثلــة الموجودة . الجينات فى مجاميع الارتباط المختلفة (على الكروموسومات المختلفة) تعمـــل باستقلالية أحدها عن الأخرى (عشوائيا) عند الانقسام الميـــوزى . الجينـــات داخـــل نفـــس مجموعة الارتباط على نفس الكروموسوم قد تنفصل خلال الانقسام الميوزى بسبب العبـــور ولكن هذا يعتمد على البعد الخاص بالجزء محل الاعتبار على الكروموسوم . الجينات التـــى توجد قريبة جدا من بعضها فى الوضع الطبيعى تميل الى الانعزال المرافق ويقال عنها أنــها مرتبطة بإحكام .

خرائط الارتباط الوراثية

علاقات الارتباط بين الجينات تمثل تقليديا فى صورة خرائط الارتباط الوراثية والتى فيها تمثل كل مجموعة ارتباط (كروموسوم) كخط عليه سلاسل مـــن المواقـــع (مواضـــع الجينات أو المجاميع الجينية) معلمة . المسافات ما بين المواقع والتى تتناسب طرديا مـــع تكرارات إعادة الاندماج بين المواقع عادة تعطى فى صورة " وحدات خريطية map units أو السنتيم أورجانز Centimorgans حيث واحد سنتيم أورجان يساوى ١% إعادة دمج فى كل جيل . من الناحية التقليدية فان علاقات الارتباط هذه تشتق من دراسات معاودة الارتباط لصفات فينولوجية (مورفولوجية) متميزة أو علامات فى الجيل الأول F1 والتى نتجت مـــن آباء متجانسة . الكروموسومات المتجانسة فى أفراد الجيـــل الثـــانى F2 تحتـــوى وتمثـــل مخاليط مختلفة من شرائح كروموسومات الآباء .

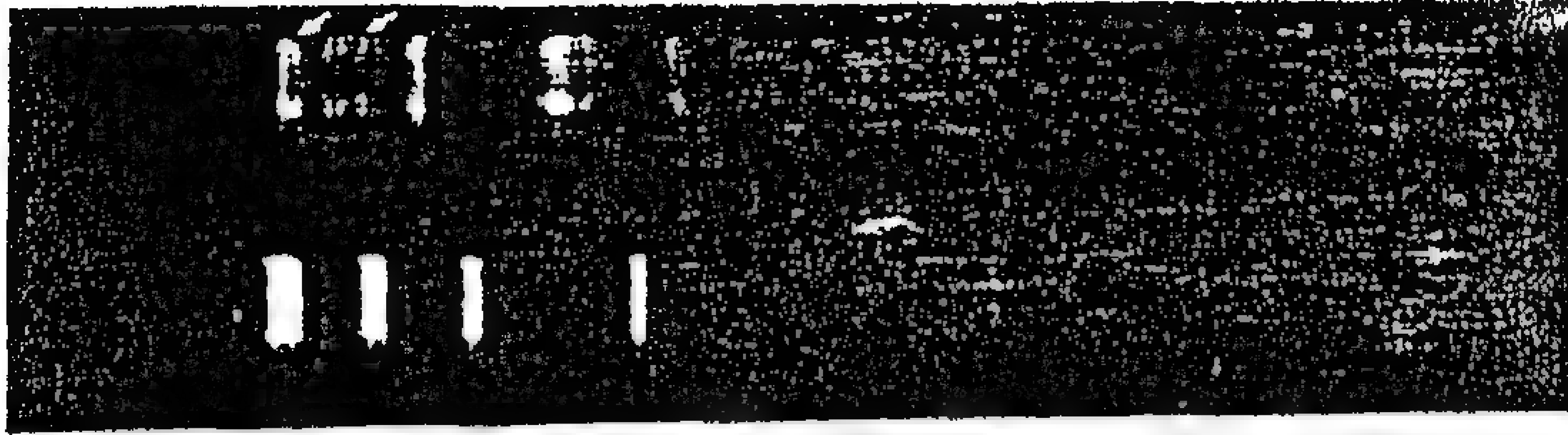
الكروموسومات المتماثلة لأفراد الجيل الثانى تتضمن مخاليط مختلفة مـــن شـــرائح كروموسومات الآباء . تعتمد دراسات الارتباط فى هذه النباتات على حقيقـــة أن الشـــرائح

الكروموسومية التى لا توجد على نفس الكروموسوم تتجه نحو إعادة الدمج العشوائى أما تلك التى توجد على نفس الكروموسوم تتجه لإعادة الدمج بتكرارية تتناسب طرديا مع المسافة الطبيعية جزئيا . الشرائح قريبة الارتباط تميل الى إعادة الدمج بتكرارية أقل عما هو الحال مع الشرائح البعيدة بمسافات ومن ثم تكون خريطة الوضع ذو المسافة وظيفة إعادة الدمج (بسبب العبور) والتى تحدث خلال تكوين الجاميطة (الانقسام الميوزى) فى نباتات الجيل الأول . فى الوضع التقليدى يؤدى التحكم الجينى الى سهولة تمييز العلامات المورفولوجية مثل الشكل الجديد للورقة والتى يمكن أن تستخدم لعمل خرائط ارتباط مفيدة بسبب الارتباط القريب جدا مع الجينات محل الاهتمام والتى لا تعطى بنفسها صفات يسهل تمييزها (مثل المقاومة للأمراض النباتية) .

خلاصة القول أن خرائط الارتباط تبنى على التحليل غير المباشر لإعادة دمج الشرائح الكروموسومية وتتضمن معلومات الموقع على الجينات التى تشفر العلامات المورفولوجية المميزة والجينات المفيدة التى ترتبط معها . من هذا المنطلق فأنها تقدم تصور هام فى الوراثة ومقدرتها على الاستخدام فى برامج التربية عندما يريد المربى الاختيار غير المباشر للجينات محل الاهتمام من خلال الانتخاب فى اتجاه العلامات المرتبطة والتى تشفر بسهولة الصفات المميزة . العلامات البروتينية (مشابهات الانزيمات isozymes) تم تحويرها واستخدامها على نطاق واسع فى برامج التربية وفى الوقت الراهن وحديثا تم تطوير علامات فينولوجية متعادلة الجزيئات (Tanksley وآخرون ، ١٩٩٠) . هذه العلامات تبنى على الاختلافات العديدة التى تحدث طبيعيا أو التشكل "polymorphisms" فى التتابع الأولى " للدنا " بين الأفراد وهذا ما يطلق عليه التشكل المحدود فى طول الشرائح (RELP's) .

تعرف RELP's باستخدام انزيمات الاندونيوكليزيس المحدودة أو المقيدة والتى كما ذكر سابقا تميز تتابعات قاعدة خاصة " للدنا " وتكسر " الدنا " عند هذه المواقع . توزيع هذه المواقع على جزىء " دنا " معين تنعكس فى عدد وحجم الشرائح المحدودة التى تنتج بعد الهضم والتى تعكس بعد ذلك تتابع جزىء " الدنا " الذى تم تحليله . الشرائح المحدودة عادة تفصل بالفرد الكهربى لجيل الأجاروز . تحديد جزئيات " الدنا " الصغيرة مثل " دنا " الميتوكوندريا عادة يؤدى الى إنتاج شرائح قليلة نسبيا والتى يمكن إظهارها وتمييزها بواسطة الصبغ ببروميد الايثيديوم للجيل نفسه . فى هذه الدراسات فأن الشرائح متعددة الأشكال يسهل تعريفها كما فى الشكل (١-١٢) . مع هذا فان الدنا النووى المحدود من الكائنات المعقدة تنتج العديد من الشرائح ومن ثم لا يسهل تعريف الحزم الفردية على الفرد

الكهربى بالجيل . فصل الشرائح عديدة الأشكال فى هذه الحالة تتطلب اجراء اختبار التعليم بطريقة ساوثرن يليها التهجين الى مجس معلم إشعاعيا والذى يهجن فقط الى بعض الحزم.



شكل (١-١٢) : التحليل المحدود " لدنا " الميتوكوندريا من صنفين مـن الأرز WuloA و Taipei ۳۰۹ توضح عدد من الأشكال . من الواضح وجود شريحتان من T30s المحدودة الخاصة . القناة M = علامات حجم الدنا ، من الشمال الى اليمين ٢٣٦٧ ، ٩٤٦ ، ٦٦٦ ، ٤٢٦ ، ٢٣٠٠ ، ١٩٦ bp .

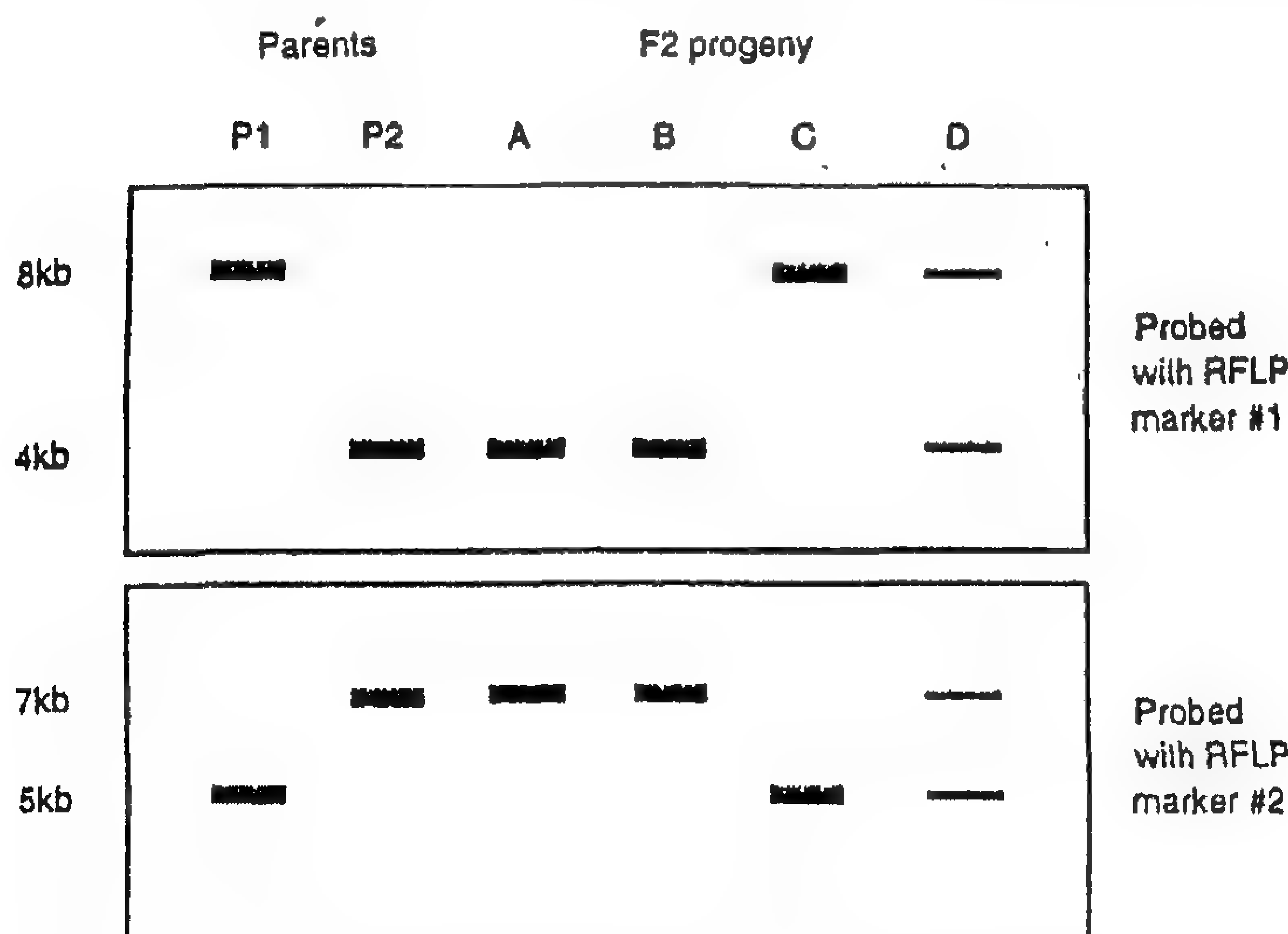
إنتاج مجسات RFLP

حدوث التشكل من عدمه يعتمد على الانزيم المحـــدد القـــاطع المســتخدم وتتـــابع النيوكلوتيد فى المجس . لذلك فان مدى المجسات والانزيمات القاطعة يجب أن تختبر لعمـل خلائط تشكل الإنزيم / المجس . جمع مكتبة من المجسات عادة يجهز بواسطة الدنا المحدود القاطع المعزول من الأنواع ذات الاهتمام . لعمل الخرائط يكون من الأهمية أن تمثل هـــذه المجسات مناطق نسخ منفردة " للدنا " . من المصادفات أن " الدنا " المتكرر غالبا ما يحقـــق مستويات غالية من المثللة وأن النيوكلييز الداخلى القـــاطع الحســاس للمثللـــة مثـــل PstI لايستطيع هضمها . أن مكتبات شرائح PstI وهى تمثل نسخ فرديـــة تكـــون مفيـــدة جـــدا كمصدر لمجسات RFLP . الشرائح الفردية تتضاعف باستخدام تكنولوجيا كلونة جينية وقد اختبرت بعضها كمجسات لتوضيح ما إذا كانت ستهجن ومن ثم تعرف للشـــرائح الخاصـــة بالتشكل المتعدد كما يحدث فى حالة الشرائح التى تظهر فى فرد واحد ولا تظهر فى الآخر.

إنتاج خرائط الارتباط RFLP

يتم إنتاج خرائط RFLP بعزل علامات RFLP والتى تورث طبقا للسيادة فى قانون مندل فى خريطة مجموع الجيل الثانى . هذا المجموع يتضمن حوالى ٥٠ فرد تنتج بنســـخ مجموع الجيل الأول من التهجين العبورى بين آباءين متجانسين والتى تتفرق وراثيا بشـــكل

كافى لتحقيق تشكل قاطع لشرائط الطول RFLP ولو أنه يظل مرتبط بوضوح وبشكل كافى بما ينتج نسل خصب . الخلائط المحدودة القاطعة الأنزيم / المجس والتى وجد لإحداث التشكل توضع فى مراتب فى خرائط المجموع . هذه تتضمن عزل الدنا ، القطع أو المحدودية ، التعليم سوثرن والتهجين " دنا : دنا " لكل فرد دمج تشكلى المجس / الانزيم . ان عمل مراتب Scoring لمعلم RFLP فى مجموع الجيل الثانى F2 بمعنى قدما للأمام بشكل نسبى بسبب أنه يوجد ٣ أنواع مختلفة من النباتات : اثنين متماثلة الزيجوت (كل منها مع واحد من الالليلات الأبوية الاثنين) وواحد غير متجانس الزيجوت (كلا الالليلين موجودتان ، كما فى الشكل ١-١٣) . الدرجة التى عندها تميل المجسات المختلفة الى الانعزال يتم تحديدها (الفرد غير المتجانس لمجس معين سوف يميل أيضا الى التناسق والتناغم مع مجسات أخرى والتى ترتبط بالأول) ومن ثم يمكن استخدام هذه المعلومة لوضع خريطة ارتباط . القواعد اللوغاريتمية فى الحاسب الآلى تستخدم لتحديد تكرارات حدوث إعادة الدمج الأكثر حدوثا وكذلك مسافات الخريطة . يوجد متاح فى الأسواق فى الوقت الراهن العديد من حزم الحاسب الآلى تحقيقا لوضع الخرائط المطلوبة . يمكن أن تستخدم التحليل الإحصائي لاختبار ما إذا كان إعادة الدمج حدث عشوائيا أم لا.



شكل (١-١٣) : رسم تخطيطى للخرائط الإشعاعية لاثنان من أغشسة الجيل الثانى . الدنا الجينومى القاطع أو المحدد ثم عمل مجس منه مع معلم RFLP ١ (القمة) ، ٢ (القاع). تجدر ملاحظة أن المجسين انعزلا فى أربعة أفراد واضحة وقد تكون مرتبطة التحليل للاحصائى لاختبار ما إذا كان إعادة الدمج حدث عشوائيا أم لا .

تحديد مجاميع الارتباط على الكروموسومات

بعد حصر المجموع ذو الخرائط مع مدى من خلائط الانزيم / المجس / enzyme probe فانه يمكن الحصول على مئات قليلة من المعلمات . عدد مجاميع الارتباط يجب أن يكون مساويا لعدد أزواج الكروموسومات المتجانسة فى النوع تحت الدراسة . مجاميع الارتباط هذه يمكن أن تحدد على كروموسومات خاصة والتى يمكن تمييزها ميكروسكوبيا باستخدام عملية تسمى التهجين فى موضعه الأصلى أو الطبيعى " in Situ hybridization " حيث يستخدم معلم RFLP معلم إشعاعيا من كل مجموعة ارتباط لكل مجس فردى ملتصق بالكروموسوم على خلية من الكوسة المجهزة . كبديل يمكن استخدام نفس العلامات المختارة لمجس " دنا " معزول من نباتات monosomic والتى قد تكون متاحة لبعض الأنواع تحت الدراسة . هذه النباتات أحادية تنقص فى كروموسوم واحد وقد تكون هناك مجموعة كاملة من النباتات كل منها أحادى لكروموسوم مختلف . تجهز أغشية النيتروسليلوز من الجيل والذى أجرى عليه فرد كهربى " للدنا " من كل من النباتات الأحادية فى قنوات متجاورة . عندما تحس هذه الأغشية فان إشارة التهجين كما تم الكشف عنها بالتصوير الاشعاعى الذاتى تبدو باهتة أو خافتة للنبات الأحادى للكروموسوم (مجموعة ارتباط) والذى منه يشتق المجس . هذا التأثير التجريبى "dosage effect" يمكن استخدامه لتحديد كل مجاميع الارتباط على كل الكروموسومات إذا كانت هناك مجموعة كاملة متوفرة من النباتات .

استغلال خرائط الارتباط RFIP

من المطلوب لعمل خرائط المجموع التى تستخدم فى عمل خريطة الارتباط RFLP الانعزال لمعلمات الجين التقليدية وكذلك معلمات RELP . هذا يسمح للجينات التقليدية أن توضع على خريطة RFLP من خلال الانعزالات المرافقة مع معلمات RFLP . هذه المعلومة قد تكون ذات أهمية خاصة فى مشروعات التربية حيث ان المربى يمكن الاختيار بشكل غير مباشر الصفات محل الاهتمام عن طريق الانتخاب لعلامات RFLP القريبة الارتباط بها . علامات RFLP ذات ميزات اضافية حيث يمكن الكشف عنها فى مرحلة مبكرة من النمو والتطور . خرائط ارتباط التشكل RFLP والتى غالبا ما تكون مشبعة فيما يتعلق بعلامات التشكل كما فى حالة أن أى جين تقليدى يرتبط عن قرب مع واحد أو أكثر منها أصبح الآن قائما لعدد من النباتات والمحاصيل . تيسر الخرائط المعروفة " قرب المشبعة near saturated " تعنى أن العديد من الجينات السابقة غير الموصفة أصبحت الآن مسئولة عن أو عرضة لعمل طرق كلونة أو نسخ جينى مثل سير الكروموسوم

chromosome walking والذى يسمح بتتابع الدنا بالقرب من نقطة التتابع المعروفة (وهي معلم RFLP) أن ينعزل وينفصل باستخدام شرائح دنا المتداخلة والمتقدمة كمجسات للتهجين .

معلمات RAPD

على عكس معلمات RFLP والتى توزث فى نظام مشارك السيادة فان معلمات RAPD تميل للسيادة ومن ثم لا تميز الزيجوتات الغير متجانسة فى المتجانسة . يستتبع ذلك أن هذه المعلمات ليست مفيدة بقدر كبير لأغراض عمل الخرائط الوراثية ولكنها قد تكون مفيدة جدا فى حالة وضع مواقع إضافية على الخرائط الموجودة من RFLP . الابحاث الجارية فى هذا المجال تتضمن استخدام PcR لتكبير ومضاعفة طول الموضع الخاص بالتشكل المتكرر العشوائي القصير(STR) والمعروف وجوده الان فى عدد من النباتات لأغراض عمل الخرائط والبصمة الوراثية .

عزل / كلونة الجينات لأغراض التحولات الوراثية

في عدد متزايد من الحالات تم انتاج نباتات متحولة وراثيا تعبر عن جينات غير متماثلة الوظائف ليس من أنواع نباتية أخرى فقط ولكن من الحيوانات أو الكائنات الدقيقة أيضا (جينات الباسلليس تورينجينسيز BT) . فى بعض الحالات عندما يستخدم اقتراب التعطيل antisense أو لأغراض التعبير المقبول للجين يصبح من الضرورى تواجد جين متماثل . أن عزل جين خاص من جينوم الكائن المعين محل الدراسة يبدو من الوهلة الأولى مثير للاحباط وتثبيط الهمم . قد توجد دلائل هامة تفيد فى تعريف التتابع الجينى أو موقعه وهذه الدلائل تستخدم كذلك فى عزل الجين نفسه . حاليا يستخدم عدد من الطرق لعزل الجينات المفيدة وهناك العديد من الأمثلة فى هذا المجال قد نشير اليها فيما بعد .

مكتبة أو خزانة الدنا الجينومى Genomic DNA library

يجب عزل أو فى العادة يتم عزل جين خاص من مخزن أو مكتبة "الدنا" الجينومى للأنواع محل الاهتمام . هذه المكتبة تتكون من تجميعه من الشرائح المتداخلة المقيدة من الجينوم والتى تكلون عشوائيا فى ناقل مناسب (ترتبط فرديا فى البلازميد وتتضاعف فى بكتريا إيشيريشا كولاى فى البيئة) ومن ثم تجمع الكولونات المعاد اندماجها والتى تمثل الجينوم الداخلى . واحد أو أكثر من الكولونات يجب أن تحتوى على كل أو واحد من التتابع المطلوب . بعد ذلك يحدث غربلة لوجود هذا التتابع . هناك اقترابات عديدة تعتمد على المعلومات المتاحة ولكن معظم الطرق اتبعت وحورت اقتراب التهجين " دنا : دنا " DNA

إقترابات التهجين لعزل الجين

أطباق المزرعة عبارة عن صورة طبق الأصل مطلية على أقراص غشائية (تتضمن هذه وضع قرص على قمة كل طبق للحصول على طبعات من مستعمرات الخلية) . تبقـى الأطباق نفسها كنسخ أصلية master copies . الخلايا الموجودة علـى القـرص تنحـل لاطلاق " الدنا " تستقل ويثبت على النيتروسليلوز فى نظام متشابة لذلك الذى وصـف فـى التوقيع الساوثرني . بعد ذلك تعامل الأغشية " بالدنا " المناسب المعلم إشعاعيا أو بمجـس " الرنا " الذى يحتوى على تتابعات مكملة للجين محل الاهتمام . التصوير بالأشـعة الذاتيـة autoradiography يوضح مواضع الكولون المطلوب / إس على الغشاء والذى يتم تعريفه حينئذ ويزال مع الموقع المقابل على الطبق الأساسى ومن ثم يحدث له تضـاعف متقـدم . المطلب الحيوى الرئيسى يتمثل فى توفير المجس المناسب والذى قد يتـأتى مـن مصـادر متعددة .

المجسات غير المتماثلة Heterologus probes

قد يكون عزل الجين ممكنا إذا كان المجس غير المتجانس متوفرا . هذا يتكون مـن تتابع جينى كلى أو جزئى مقابل عزل سابق من نوع نباتى آخر أو كائن حى آخر . يتوقـف نجاح هذا الاقتراب على مدى كفاية التتابع المتماثل مع التهجين الخاص وحدوث هذا التتابع.

المجسات الصناعية محدودة النيوكلوتيد

إذا كان من الممكن عزل المركب البروتينى للجين المطلوب وتنقيته فانه يمكن تقدير التتابعات الجزئية للأحماض الأمينية والمجسات الصناعية محدودة النيكلوتيد التـى خلقـت بسبب عدم عمومية الشفرة الجينية فان كل مجس يجب أن يتكون من مخلوط مـن هيـاكل نيوكلوتيدية وهذا قد يسبب مشاكل فى اتجاه التخصص ولو أن المعلومات الخاصة بأفضليـة الكودون فى الأنواع قد تقلل من حجم هذه المشكلة .

اقتراب PcR

إذا أمكن تخليق النيوكليتيدات الصناعية المحدودة ذات المسافات المعرفة جيدا فأنـها قد تستخدم كبادئات PcR (primers) لتكبير جزء كبير من الجين محل الاهتمام . المركـب الذى حدث له تكبير يمكن أن يستخدم كمجس أكثر خصوصية " للدنا " . هنـاك اقترابـات أخرى قابلة للتطبيق إذا كانت المعلومات الخاصة بالتتابع فى المنـاطق المكشـوفة للجيـن متوفرة حتى لو كانت المعلومات عن الجين نفسه غير متوفرة . فى هذه الحالة فأن تفـاعل PcR سوف يضخم تتابع الجين داخليا .

تحول الكروموسوم Chromosome walking

خريطة الارتباط الجزيئى عالية التشبع تقدم معلومات خاصة بالتتابع فى صورة معلمات شديدة الاقتراب RAPD , RELP للمناطق الجينية التى تجاور الجينات الموقعة على الخرائط محل الاهتمام . من الممكن استخدام هذه المعلومات فى اقتراب PcR لعزل وكلونة الجين المطلوب . من الاقترابات الأكثر تطبيقا لعزل الجين المجاور للمعلم الجزيئى تلك التى تتمثل فى استخدام المعلم كمجس لتعريف الكولون المتجانس واستخدامها فى المقابل لمجس لتعريف الكولونات المحتوية على الشرائح المتداخلة والتى تكون قريبة من المواضع المطلوبة وهكذا . فى هذا الطراز يصبح من الممكن التحول "walk" على طول الكروموسوم حتى الوصول الى الجين المطلوب . تجدر ملاحظة أن عند كل مرحلة فان التتابعات الجزيئية عند نهاية كل مجس يجب أن تقدر للتأكد من حدوث التجول او السير فى الاتجاه الصحيح . بالإضافة الى ذلك فانه لكى يعمل التكنيك بشكل مرضى فان كل مجس يجب أن يقابله تتابع مفرد منسوخ .

التفرقة المتباينة لمكنونات cDNA

تضم مكتبة أو مخزن cDNA تجميع الكولونات التى تحتوى على نسخ معاكس للـ mRNA المعزول من نسيج معين (مرادف لمكتبة "الدنا" الجينومية) . كل كولون يتطلب واحد فقط من cDNA ولكن كولونات مختلفة قد تكتسب نفس النوع من جزىء cDNA . يمكن أن تستخدم هذه المكتبات لتعريف الجينات النباتية التى تعبر عن نفسها بشكل متخصص فى أنسجة خاصة والتى تحفز فى بعض الأوضاع بالتتابع المقارن مع cDNA الناتج من أنسجة مختلفة أو غير محفزة من نفس النبات . يمكن تحقيق ذلك بالتفرقة المقارنة بين مكتبة cDNA للنسيج المستهدف مع مدى مجسات تهجين cDNA الناتجة من mRNAs لكلا النسيجين . الكولونات التى تهجن مع مجسات cDNA من نوع واحد من النسيج معروف أنها تعبر عن نفسها فى هذا النسيج . "الدنا" ذات التخصص النسيجى أو "الدنا" المحفز تعرف فى هذا المضمار ومن ثم يمكن استخدامها لجس مكتبة "الدنا" الجينومية للحصول على الجينات المقابلة كاملة الطول .

التفرقة المتباينة لمكنونات تعبير cDNA

تجدر ملاحظة أن ترجمات cDNA فى جينات الكائنات الأولية تكون مفيدة فى دراسات الدمج عندما يكون من الضرورى التعبير عن الجين الأولى فى الكائن الأولى prokaryote حيث أنها تعانى فعلا من نقص الإنترونات introns التى تمنع التعبير الصحيح عن الطول الكامل للجين الأولى بسبب عدم مقدرة الكائنات الأولية على توصيل

الجينات . هذا يفيد فى تعريف الجين ولأغراض الكلونة فى حالـــة مـــا إذا كـــانت مكتبـــة كولونات cDNA معبر عنها بشكل طبيعى فى البكتريا الحساسة فان الجين محل الاهتمـــام يمكن تعريفه باستخدام الضغط الانتخابى الكيميائى المناسب للخلايا البكتيرية . هذا الاقتراب قابل للتطبيق كما فى عزل الجينات المقاومة للمبيـــدات . الخلايـــا التـــى تقـــاوم الضغـــط بالكيميائيات يتم كلونتها ومن ثم تقدم مجسات cDNA صالحة للمكتبة الجينوميـــة . هـــذه المكنونات التى تعبر عن cDNA يمكن أن تفرق وتقـــارن باســـتخدام اقـــتراب المناعـــة immunological . الكولونات المندمجة تنسج فى أطباق علـــى أقـــراص النيتروســـليلوز وتحطم لإنتاج البروتين الذى يرتبط بالغشاء . إن وجود البروتين الغريب يمكن الكشف عنـــه باستخدام الجسم المضاد المتجانس أو غير المتجانس إذا كان متوفرا باستخدام نظام الكشـــف بالجسم المضاد الثنائى أو المتضاعف .

استخدام الطفرات فى عزل الجين

التكامل الوظيفى Functional complementation

فى العادة يتضمن هذا التكامل الوظيفى تحول المطفرات والتى تعتـــبر مخرجـــات auxotropric للمادة التى تمنح بالجين محل الاهتمام مع الكلونات من المخزون الجينومـــى للنوع تحت الدراسة . التتابع الأولى للمخرجات الأولية prototrophy فى المطفر المتحول وراثيا تؤكد أن الكلون المتحول يتحول على الجين المطلوب . هذا الاقتراب يعتمـــد علـــى توفر المواد المطفرة المناسبة حتى لو كانت مطفرات عديمـــة التجـــانس مثـــل مخرجـــات الفطريات تستخدم فى كلونة الجينات النباتية .

تعليم النقل Transposon tagging

عناصر النقل أو transposons عبارة عن حدوث تتابع طبيعى للحامض النـــووى "دنا DNA" مع مقدرة على القفز أو النقل من موقع جينومى الى موقع آخر . يبدو أن هـــذه عملية عشوائية قد تؤدى الى إدخال العنصر الناقل " ترانسبوسون " فى الجين أو فى تتابعاته المنتظمة كما فى التغير الوراثى للتعبير عن هذا الجين ومن ثم تحدث الطفرة . لذلك تستخدم الناقلات على نطاق واسع لخلق طرز طفرية والتى ثبت فعاليتها فى دراسات وظيفة الجين . تعليم النقل عملية تشمل غرس الناقل فى الجين مما يحدث تغيير محسوس ومعـــروف مـــن الطرز الوراثي ولذلك يمكن استخدام الناقل نفسه كمجس للتهجين لعزل هذا الجين . لقد تـــم تطوير هذا الاقتراب فى نباتات الذرة حيث تم تعريف عناصر النقـــل بشـــكل جيـــد . الآن تستخدم عناصر النقل كمعلمات غير متجانسة لعزل الجين فى أنواع نباتية أخرى .

الطرح الجينومى Genomic substraction

يعمل الطرح الجينومى على تعريف تتابعات " الدنا " التى توجد فى الكائن السبرى (التتابعات المستهدفة) ولكنه غائب فى الطفرة المشطوبة متجانسة الزيجوت . تتضمن الطريقة تهجين متضاعف بين شرائح الدنا المقيدة من النوع السبرى والشرائح الصوتية الزائدة للدنا الحيوى biotinylated من الطفرة الشاطبة . فى كل تهجين متتابع تضاف كريات مغلقة بالامثيدين للتخلص من جزئيات التهجين الحيوى (الأمثيدين والبيوتين ذات قابلية قوية أحدهما للآخر) والتى تمثل التتابعات الشائعة للنباتات . بعد دورات عديدة فإن الدنا المتبقية تكون غنية فى التتابعات والتى تكون غائبة فى الطفرة الشاطبة .

التحولات الوراثية فى النباتات

مقدمة عن الاستراتيجيات الجزيئية لإدخال صفات مفيدة فى المحاصيل

لقد حدث تقدم كبير فى تكنولوجيا كلونة الجين فى السنوات الأخيرة مما أدى الى تطوير استراتيجيات إدخال الصفات المرغوبة فى النباتات . لقد حدث تقدم كبير فى مجال تحفيز النباتات نحو مقاومة الفيروسات والحشرات وكذلك تحقيق تحمل كبير للنباتات ضد مبيدات الحشائش وهذا ما سوف نتناوله بالتفصيل فيما بعد ولو أننا سنشير الى بعض من هذه الاقترابات فى هذا المقام .

المقاومة للفيروسات Virus resistance

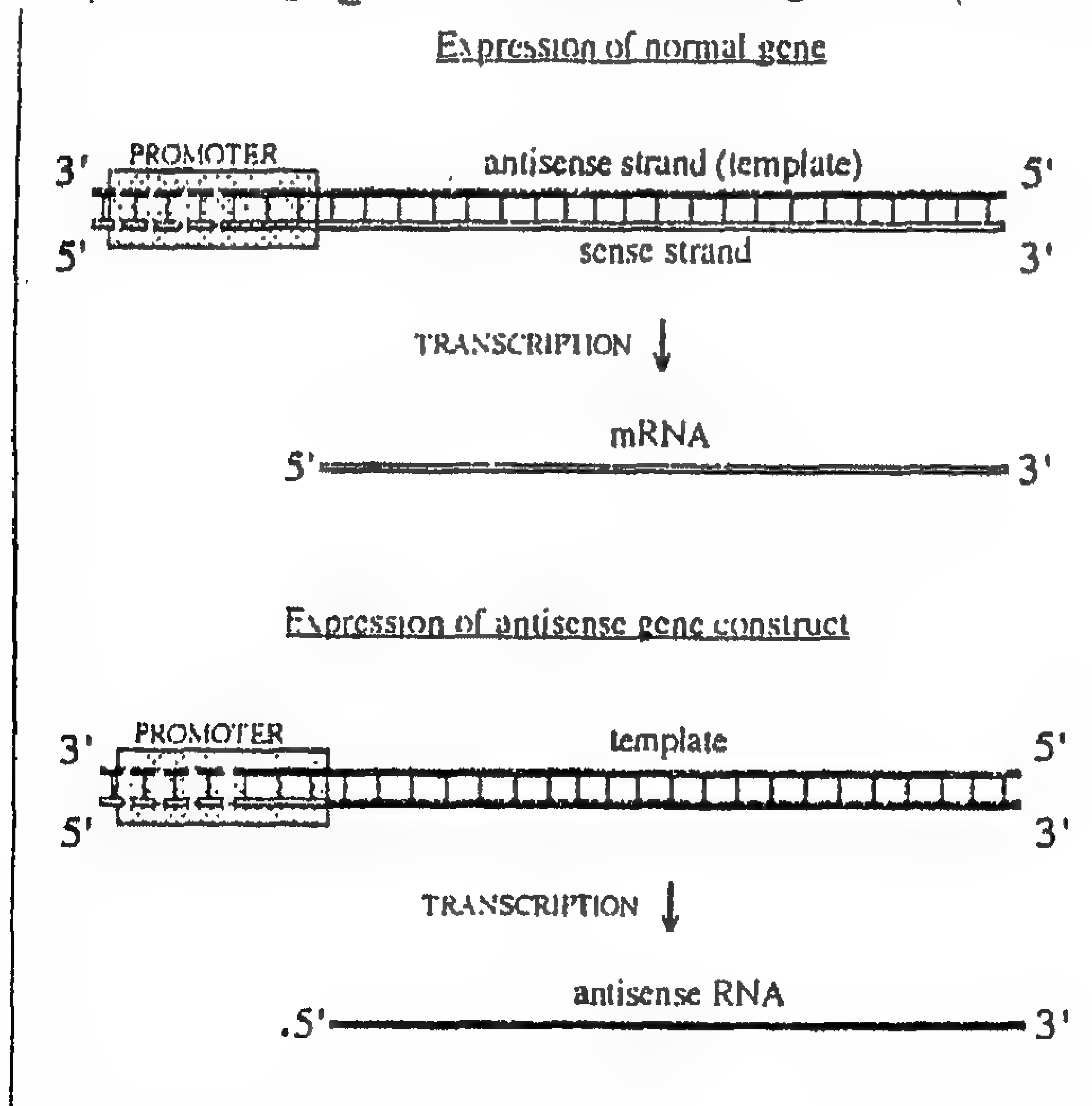
لقد تم تطوير استراتيجيتان رئيسيتان لإدخال صفة المقاومة للفيروسات فى النباتات :

* المقاومة بسبب البروتين المغلف Coat protein mediated resistance : لقد تم تحقيق هذا الهدف فى عدد من المحاصيل من خلال تحويل النباتات مع جينات الفيروس والتى تشفر البروتين المغلف . تراكم هذا البروتين فى الخلايا غير المعدية والتى تنتج عادة فى الخلايا النباتية المصابة لحوصلة "دنا" الفيروس المتضاعف مما يؤدى الى تحقيق مقاومة فعالة . هذا قد يرجع الى تغريق المواقع المستقبلة داخل خلايا النبات مما يجعل جسيمات الفيروس الغازية غير قادرة على الارتباط ومن ثم تصبح غير فعالة . هناك أدلة تقترح أن دخول جسيمات الفيروس فى النسيج الوعائى يغرس فى النباتات المتحولة ومن ثم يحد من انتشار العدوى .

جينات التعطيل Antisense genes

لقد أمكن تحقيق المقاومة للفيروس من خلال اقتراب مضادة الحس والذى يتطلب الشرح بإسهاب حتى يمكن فهمه . فى الكائنات الأولية تنتج الجينات تتابعات "دنا" زوجية

الشرائط . مع موضع معين فان الشريطان يتميزان الى حس Sense ومضاد للحس والأخير يزود بصفين لتخليق جزىء mRNA المكمل . جزىء الرنا mRNA المنسوخ له نفس تتابع شريط " دنا " الحس (تجدر ملاحظة أنه عند المواقع المختلفة على طول نفس الكروموسوم فان الدلالة حس / لا حس قد تختلف حيث أن البادىء promoter المنظم المتخصص التتابع فى اتجاه كل جين يعطى تعليمات لانزيم بوليميريز " الرنا " والذى يستخدم شريطه كصفيحة) . مع الجين المعنى (كمثال بروتين غطاء الفيروس) فى حالة عزله وكلونته وإدخاله فى ناقل التحول (مثال الورم المحفز لبلازميد Ti) فى التوجيه المعاكس أو المضاد للحس وحينئذ يستخدم لتحويل النبات خلال النسخ فى المحول فان شريط "الدنا" الخاطىء يستخدم كصفيحة . هذا الوضع سيؤدى الى إنتاج "رنا" مضاد للحساب والذى يملك تتابع متكامل للرنا mRNA البادىء لهذا الجين المحول transfomant سوف ينتج نوعان من "الرنا" مختلفان ولكنهما مكملان وهذه هى الظاهرة التى تثبط الترجمة ومن ثم تؤثر على نشاط الجين فيما بعد النسخ فى اتجاه تنظيم التعليمات (شكل ١-١٤) .



شكل (١-١٤) : إنتاج " الرنا مضاد الحس " ذات التتابع المكمل للرنا العادى mRNA للجين محل الاعتبار مما يؤدى الى إنتاج اثنان من "الرنا" مختلفان ولكنهما متكاملان . داخل الخلية يمكن لهذه الرنا التهجين بسبب التتابع المتكامل مما يؤدى الى تثبيط الترجمة بما يؤثر على نشاط الجين فى إصدار التعليمات بعد النسخ .

إدخال جينات الفيروس المعطلة فى النباتات سوف يؤثر على تثبيط إنتاج البروتين المغلف ومن ثم يحد من إنتاج جسيمات فيروس جديدة فى الخلايا المصابة . تجدر ملاحظة أن اقتراب تضاد الحس.ذات كفاءة عالية فى العديد من مجالات تحوير وراثية النباتات والتى تكون التعبيرات الجينية ذات فائدة خاصة فى اتجاه تغيير فسيولوجية نضج الثمار من خلال تثبيط الجينات المرتبطة بالنضج .

المقاومة للحشرات Insect resistance

جينات البكتريا .B.T (باسيلليس ثورينجنسيز) كمثال تنتج بروتينات فعالة فى مكافحة الحشرات والتى استخدمت طويلا رشا كمبيدات حشرية لمكافحة حشرات حرشفية الاجنحة بسبب صفاتها كسموم داخلية . إن اكشاف تكنولوجيا التحولات الوراثية أدت الى إدخال جينات .B.T فى العديد من الأنواع النباتية مما أدى الى السيطرة على التلف الذى تحدثه اليرقات . لقد استخدمت استراتيجية أخرى من خلال الجينات النباتية المحورة التى تعطى مواد مضادة للتغذية مثل مثبطات البروتييز والتى تقلل بشكل كبير من مقدرة الحشوة على هضم المواد النباتية .

المقاومة لمبيدات الحشائش Herbicide resistance

لقد أمكن تحقيق هذا الهدف من خلال ثلاثة اقترابات عامة إعتمادا على مبيد الحشائش محل الاعتبار ومدى تيسر الجينات : غالبا تستخدم الجينات غير المتماثلة كما فى الجينات المطفرة والتى عزلت من الخلايا من مزارع الأنسجة التى عرضت لمبيد الحشائش فى الخارج . يمكن أن تحدث هذه الطفرات تلقائيا فى الخلايا النباتية النامية فى الخارج بسبب الظاهرة المعروفة بالتغيرات النسيجية الكلونية .

الإنتاج الفائق للموقع البيوكيميائى المستهدف من قبل مبيد الحشائش

يمكن تحقيق ذلك من خلال نقل نسخ إضافية من الجين الذى ينتج الهدف البيوكيميائى لمبيد الحشائش محل التساؤل أو ينقل جين الشفرة الذى ينتج انزيم ذات نشاط محفز . هذا يتطلب معلومات تفصيلية عن الانزيم المستهدف وتيسر الجين الذى ينتجه . بوجه عام فان الجينات غير المتماثلة استخدمت فى هذا الاقتراب ولكن الموضع المستهدف للمطفر المتماثل مع مستويات التعبير المكبرة المعزولة من خطوط الخلايا المختارة فى الخارج (خلايا مزارع الأنسجة التى تكتسب مقاومة فى الخارج) قد استخدمت .

نقص قابلية مبيد الحشائش للهدف

هناك عدد من الأمثلة تكون فيها الجينات فى نوع الكائن اكتسبت الطفرات من خلال الانتخاب فى الخارج وهذا لا يؤثر طويلا على مبيد الحشائش محل التساؤلات . إذا تم عزل

وكلونة هذه الجينات فأنها يمكن أن تستخدم لتحويل أنواع أخرى فى اتجاه المقاومة لمبيد الحشائش .

نقل الجين المسئول عن فقد سمية وانهيار مبيد الحشائش

جينات البكتريا القادرة على انهيار وفقد سمية بعض مبيدات الحشائش أمكن تعريفها وكلونتها ونقلها فى النباتات لإنتاج متحولات مقاومة للمبيد . سوف نتابع موضوع النباتات المقاومة لمبيدات الحشائش فى مواضع لاحقة من هذا الكتاب .

استخدام نظام الناقل الطبيعى فى التحولات الوراثية

بمجرد تعريف الجينات المفيدة ووضع الاستراتيجيات المناسبة يجب أن تتوفر طرق جيدة تعطى نفس النتائج عند تكرار العمل بها reproducible لإدخال مادة الجين الغريب فى مدى واسع من المحاصيل الهامة . من أكثر الطرق شيوعا فى إدخال الجينات الغريبة فى النباتات ما يتمثل فى نظام التحول الطبيعى لبكتريا التربة " أجروباكتيريوم " والطريقة الشائعة فى مزارع الأنسجة النباتية . زراعة الأنسجة طريقة للحفاظ على والتحوير أو التحكم فى نمو الأعضاء النباتية والأنسجة والخلايا تحت الظروف الغذائية والبيئية المناسبة فى خارج الخلايا مما يؤكد أن النباتات الجديدة تخلق جديدا من الخلايا التى تغيرت وراثيا بعد التداخل مع الأجروبكتريا . فى البيئة الطبيعية فان النوع البرى أجروباكتيريوم تومينيسينس يسبب مرض تأليل التاج . البكتريا تملك من الناحية التقليدية والخصائصية مقدرة على تحفيز حدوث الورم أو Ti بلازميد والذى ينقل جزء منه T-DNA الى الخلايا النباتية حال حدوث العدوى . الجزء T-DNA الذى يحتوى على موضع التخليق الحيوى للأوبين وموضع حدوث الورم يصبح متكاملا فى الجينوم النباتى حيث تعبيرات الجينات الغريبة المميزة تزيد من نمو الأورام بسبب خلق خلايا نباتية لا تميز تخليق الأوبين . جزء Ti بلازميد الممسوك بواسطة البكتريا يحتوى على جينات عنيفة والتى تلعب عددا من الأدوار الحيوية الهامة فيما يتعلق بعملية العدوى وجينات تمثيل الأوبين والتى تسمح للكائنات الدقيقة باستخدام الأوبين (من بينها يوجد عدد من الأنواع تتضمن الأوكتوأوبين والمانوأوبين) كمصدر متميز للكربون / نتروجين .

البيوتكنولوجيا النباتية والعاملين فيها أصبحت لديهم القدرة للعمل بنظام التحول الطبيعى لبكتريا A.tumefaciens من خلال عمل بلازميدات Ti محورة تعانى من نقص المواد المحفزة لحدوث الأورام غير المرغوبة والتى ترتبط اختياريا بالجين المعلم مثل المقاومة للمضادات الحيوية والموجودة فى منطقة T DNA . الجينات المسئولة عن العنف يجب أن تمسك داخل البلازميد لتأكيد نقل الجين الفعال ولو أنه فى العديد من الحالات

يستخدم الباحثون نظام ناقل ثنائى binary vector system حيث تكون جينات العنف موجودة على البلازميد الثانى تعمل فى تقارب مع البلازميد المحتوى على T-DNA . بكتريا الأجروباكتيريوم التى تحتوى خلاياها على هذه البلازميدات المندمجة تستخدم تباعا لنقل الأنسجة النباتية فى الخارج من خلال تعريض النسيج النباتى وفى العادة يكون قرص من نبات لمعلق البكتريا . المادة الوراثية المهندسة فى النبات يعاد تخليقها من الخلايا المتحولة ويمكن تعريفها فى مرحلة مبكرة من النمو باستخدام بيئة متخصصة (تحتوى على مضاد حيوى) عليها الخلايا التى اكتسبت جينات المقاومة للمضاد الحيوى من T-DNA المحور والتى تصبح قادرة على النسخ والتكرار فى النباتات . أن وجود الجين الغريب يتأكد من خلال التحليل الجزيئى ومن ثم يمكن اختبار مدى التحمل فى النباتات للضغوط الحيوية واللا حيوية . طريقة التحول هذه وغيرها من الاقترابات المماثلة التى تستخدم A.rhizogenes (وهى بكتريا ذات علاقة قريبة والتى تسبب مرض الشعيرات الجذرية من خلال فعل تحفيز الجذر أو Ri بلازميد ولكنها يمكن أن تفقد الأذرع بشكل مناسب) وقد ثبت نجاحها الكبير فى التحولات الوراثية . من الجدير بالذكر أن المدى العوائلى للأجروباكتيريا محدود على النباتات ثنائية الفلقات لذلك يجب تطوير طرق أخرى بديلة لدراسة التحول فى مجموعة هامة من النباتات خاصة الحبوب .

الطرق البديلة للتحول Alternative transformation methods

أ – الدخول المباشر " للدنا " فى البروتوبلاست : من أكثر الطرق أهمية فى تحول نباتات الحبوب تلك التى تتضمن التداخل بين الخلايا النباتية والبلازميد المندمج فى الخارج . يجب أن يكون البلازميد صغير ويحتوى على الجين محل الاهتمام والمعلم المختار والتتابعات المناسبة للتنظيم كما يجب أن تكون قادرة على التضاعف فى النبات وفى بكتريا E.coli لأغراض الاكثار . الخلايا النباتية الفردية تسمى بروتوبلاست (الخلايا والتى يستتبع المعاملة بالانزيمات إحداث عدم وجود جدار الخلية وترتبط فقط بغشاء البلازما) والتى تكون معلقة فى المحلول المحتوى على البلازميد وتتعرض للمعاملات الكيميائية أو الكهربية والتى تحفز تكوين ثقب انتقالى فى الغشاء . بعد ذلك يؤخذ " دنا " البلازميد ويتكامل فى الجينوم النباتى فى تكرارية منخفضة ولكنها معنوية كما فى حالة معاودة إنتاج البروتوبلاست المتحولة فى النباتات باستخدام طرق زراعة الأنسجة المتقدمة ومن ثم إنتاج أفراد متحولة وراثيا .

ب– قذف أو دفع الجسيم particle bombardment : لقد أختبرت العديد من الطرق البديلة لإدخال الجينات الغريبة فى النباتات (potrykus ، ١٩٩٠) ولكن طريقة

واحدة فقط ثبت كفاءتها وتكرارية تأكيد نتائجها . هذه الطريقة يطلق عليها " قذف أو دفع الجسيم أو موضع الجسيم " أو اقتراب البيوليستيك "biolistic" والذى يتضمن إسراع أو زيادة نشاط وحركة كريات المعدن الميكروسكوبية المغلقة للدنا فى الخلايا النباتية المستهدفة. لقد أمكن تحقيق إسراع الجسيم بوسائل عديدة بما فيها التفريغ الكهربى أو الهواء المضغوط (بندقية هواء) وتفريغ مسحوق البندقية (مدفع بادىء محور) . عادة تكون الخلايا المستهدفة عادة تكون مزارع الكالاس (مزارع خلايا نباتية غير متباينة التفرق ورميا) والتى وبعد أن تقذف بالموضع يسهل مضاعفتها واكثارها على بيئة متخصصة . حديثا استخدمت أجنة البذور المطحونة كمواقع مستهدفة . استخدام أجنة البذور مثير للاهتمام حيث لا يكون مطلوبا خطوات زراعة الأنسجة ولكنه وبسبب معدل التحول القليل جدا وبالرغم من كفاءته الكبيرة واعطاؤه نتائج قاطعة إلا أنه يحتاج الى عمالة ضخمة وتكاليف باهظة لأن العديد من النباتات يجب أن تنمو تحت ظروف خاصة جدا وتختبر باستخدام الطرق الجزيئية .

تعريف مواد التحول Identifying transformants

مواد التحول التى تتولد على بيئة متخصصة يجب أن تتعرض للتحليل للتأكد من وجود هيكل الجين الغريب . يتطلب التأكيد الايجابى اقترابات متعددة التخصصات تتضمن واحد أو أكثر من الاختبارات البيوكيميائية والتحليل الجزيئى . عادة تعتمد الاختبارات البيوكيميائية على طرق التحليل المعروفة للانزيمات المرتبطة بجينات علامات ترتبط عن قرب بالجين محل الاهتمام على البلازميد المحول . هذه تقدم تأكيد غير مباشر عن وجود الجين محل الاهتمام . يمكن أن يستخدم التحليل الجزيئى كذلك بشكل غير مباشر للكشف عن تتابع الجين المعلم أو مباشر للكشف عن تتابع الجين الغريب .

أ – الطرق البيوكيميائية

جينات التعليم Marker genes

يستخدم أعداد متزايدة من جينات التعليم بشكل روتينى كعلامات مختارة تدخل فى ناقلات التحول النباتى . بسبب ارتباطها القريب من الجين محل الاهتمام فان تعبيراتها تقدم دليل جيد عن نجاح نقل الجين فى مرحلة مبكرة من تطور النبات المفترض أنه تحول . التعبير المرحلى والثابت للجين ومعلمات الجين شائعة الاستخدام . يستخدم الأول للحصول على علامات أولية عن الوصول الناجح للجين حيث أنه يعطى إشارة تعبير جينى دون الاعتماد على تقدم ودور للجين الثابت خلال فترات قصيرة جدا من حدوث التحول . الأخير

يتم الكشف عنه من خلال التعبير الثابت لها على فترات طويلة بعد التحول . سوف نناقش فى هذا المقام ثلاثة من المعلمات المختارة الأكثر شيوعا فى عمليات التحول النباتى :

* **الجين الناقل لأسيتيل الكلورا مفينيكول** : الجين البكتيرى الناقل للأسيتيل كلورامفينيكول (cat) يملك مقاومة للكلورامفينيكول وغالبا ما يستخدم كمعلم يعبر عن الانتقال المرحلى بسبب توفر طريقة لتحليل انزيم كلورامفينيكول أسيتيل ترانسفيريز (CAT) . يتضمن ذلك تحليل كروماتوجرافى للكشف عن إدخال وغرس الجزء المعلم إشعاعيا بالكربون المشع (١٤) للكلورامفينيكول فى نواتج الأستلة الخاصة به بعد فعل أى CAT موجود فى مستخلصات الخلية من النسيج المفترض حدوث تحول له . إذا كان ضروريا يمكن التعبير عن مستوى الاستجابة كميا من خلال قياس مستوى النشاط الاشعاعى فى نواتج الأستلة باستخدام عداد الايماض "Scintillation" .

* **جين البيتاجلوكوريندار** : الجين المكلون للبيتاجلوكورونيداز (gus) للبكتريا E.coli استخدم على نطاق واسع كناقل ومعبر جينى ثابت كمعلم فى دراسات التحول النباتى يلحم مع الجين محل الاهتمام فى تكوين الجين الوهمى وتحت تحكم تتابعات تنظيمية مناسبة . انزيم البيتاجلوكورنيداز (GUS) يمكن أن يكشف عنه بسهولة من خلال استخدام مدى واسع من الطرق الاسبكتروفوتومترية والفلورومترية والوسائد النسيجية الكيميائية وكلها متوفرة تجاريا فى الأسواق . مستخلصات الانزيم من المواد المتحولة مطلوبة للتحليل الاسبكتروفوتومترى ولكن التقدير النسيجى الكيميائي الذى يقدم معلومات عن التعبير الموضعى للجين يجرى فى أنسجة مثبتة باستخدام مادة وسيطة تعطى مركب داخلى متميز بعد فعل Gus والأكسدة . هناك تقارير تشير الى أنشطة داخلية تماثل Gus فى تنوع كبير فى الأنواع النباتية وهذا يستدعى استخدام واعى لاختبار المقارنة فى التجارب التى تستخدم جين gus . بالإضافة الى ذلك فان فى دراسات التحول المبكرة أدى تلوث الأنسجة المتحولة بالناقل البكتيرى المندمج " أجروباكتيريوم " الى نتائج إيجابية كاذبة بسبب كبر الـ gus فى خلايا البكتريا الملوثة عما هو الحال فى الخلايا النباتية . لقد أمكن التغلب على هذه المشكلة من خلال إضافة الانترون للجين ومن ثم لا تكون هناك إمكانية للتعبير الجينى (الكائنات الأولية لا تستطيع توصيل نسخ الدنا الأولى) .

* **جين نيومايسين فوسفوترانسفيريز II** : استخدم كمعلم للتعبير الثابت عن الجين حيث يوضح الجين البكتيرى (npt II) وجوده فى أنسجة النباتات المتحولة من خلال تحقيقه لمقاومة المضاد الحيوى . هذا بسبب فعل الفسفرة لأنزيم نيومايسين فوسفوترانسفيريز II (NPT II) على مدى من المضادات الحيوية بما فيها الكاناميسين و G 418 . وجود هذا

الجين المعلم والذى يرتبط مع الجين محل الاعتبار فى تكوين الجين المنشود غالبا ما يتأكد من خلال التحليل الاشعاعى للـ NPT II حيث أن نقل الفوسفور المعلم إشعاعيا (P32) من ATP32 الى المضاد الحيوى يمكن الكشف عنه فى مستخلصات النسيج المجزئة من المادة المحولة . لقد وجد أنه فى عدد من الحالات أن استخدام الكاناميسين للانتخاب يمكن أن يؤدى الى صعوبات فى الاكثار النباتى إلا إذا كانت فترة التعريض مناسبة بشكل خاص.

طريقة الكشف المناعى Immunological methods

وجود بروتين غريب فى النباتات المتحولة (التى تحدث بواسطة الجين محل الاهتمام أو الجين / جينات المعلمة) يمكن تقديرها بطريقة اختبار المناعة البسيط والذى يطلق عليه " التحليل المناعى للنقطة والبقعة dot blot " إذا كانت الأجسام المضادة متوفرة للبروتين محل التساؤل . يستخدم محلول البروتين الكلى لمرشح النيتروسليلوز عبر حفرة بلاستيكية غير ثابتة الوجود (قابلة للإزالة) حيث يسحب السائل تحت تفريغ والبروتين المرتبط يكشف عنه باستخدام طريقة الجسم المضاد المزدوج .

الطرق الجزيئية Molecular methods

على خلاف طرق التحليل البيوكيميائية أو المناعية فان هذه الطرق لا تحقق تقييم التعبير الجينى ولكنها تعطى دليل مباشر عن وجود تتابع الجين الغريب .

تهجين الحمض النووى Nucleic acid hybridization

تحليل البقعة لساوثرن لكل محول متوقع يمكن اجراؤه باستخدام الجين محل الاهتمام أو تتابع الجين المعلم كمجس متخصص معلم إشعاعيا . أن وجود التتابعات المكملة كما كشف عنها بالإشعاع تعطى دليل جيد لوجود الجين الغريب المتكون من المادة المحولة المتوقعة . من أكثر الاقترابات سرعة ما تتضمن تحليل الحمض النووى بالنقطة والبقعة المناعى (dotblot immunoassay) حيث يتم تحليل محلول من " الدنا " الكلى من المحول المتوقع ثم يستخدم على مرشح ويثبت ويهجن على المجس المعلم إشعاعيا .

تكبير " الدنا " DNA amplification

لقد زاد استخدام PcR كطريقة للكشف عن تتابعات الجين الغريب فى المواد المتحولة المتوقعة . إن استخدام الدنا الكلى من كل محول متوقع كصفيحة وكبادئات والتى توصف جزء من تكوين الجين الغريب وتكبير شريحة " الدنا " ذات الحجم المتوقع كما قدرت بالفرد الكهربى للجيل تقدم دليل جيد عن وجود الجين الغريب . يمكن الحصول على

تاكيد بواسطة تبقيع وتهجين مركب ناتج PcR على مجس متخصص من خـــلال التحليـل المقيد أو المحدود بواسطة تتابع جزء من كل الشرائح المكبرة .

حدود التكنولوجيا الجارية فى التحول الوراثى فى النباتات

بالرغم من التطور المذهل فى اقتراب القذف المدفعى للجسيم والنجاح المعروف فـى إنتاج الحبوب المهندسة وراثيا من خلال إدخال " الرنا المباشر " فى البروتوبلاســت فانــه مازالت هناك حاجة لتطبيقات عملية كطريقة تحول سهلة فى الحبوب . مازال هناك الكثـير من الفن والعمالة فى إنتاج مزارع الأنسجة الخاصة والمناسبة فى طرق التحول الحاليـــة . البادىء الموجود فى مسار الجين هو تتابع "دنا" ينظم التعبير الجينى مـــن خـــلال النســخ المباشر . فى الوقت الراهن يعتبر البادىء CaMV 35 S المشتق من الممـــرض النبـــاتى فيروس موزايك القرنبيط من أكثرها شيوعا . من المطلوب توفير بادئات ذات كفاءة عاليـــة لتحسين مستويات التعبير فى الجينات الغريبة فى النباتات المتحولة لتحقيق الاستخدام الكامل لمدى من الجينات المكلونة وكل هذا متوفر حاليا .

REFERENCES

Alwine, J.C. Kemp, D.J. Parker, B.A., Reiser, J., Renar, J., Stark, G.R. and Wahl, G.M. (1979). Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. Methods in Enzymology, 68, 220-42.

Beachy, R.N., Loesch-Fries, L.S. and Tumer, N.E. (1990). Coat protein-mediated resistance against virus infection. Annual Review of Phytopasthology, 28, 451-74.

Burnette, W.N. (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinate dprotein A. Analytical Biochemistry, 112, 195-9.

Draper, J., Scott, R., Armitage, P. and Walden, R. (1988). Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Innes, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (1990). PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, CA.

Mullis, K.B. and Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology, 155, 335-50.

Old, R.W. and Primrose, S.B. (1985). Principles of Gene Manipulation, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Potrykus, I. (1990). Gene transfer to plants: assessment and perspectives. Physiologia Plantarum, 79, 125-34.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-91.

Saiki, R.K., Scharf, S.J. Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Amheim, N. (1985). Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, Science, 230, 1350-54.

Sambrook. J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanger, F., Nicklenk, S. and Coulson, A.R. (1977). Dna sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science USA, 74, 5463-67.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology, 98, 503-17.

Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H. and Bonierbale, M.W. (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. Bio/Technology, 7, 257-64.

Watson, J.D., Tooze, J. and Kurtz, D.T. (1983). Recombinant DNA: A Short Course, Scientific American Books, New York.

Weinberg, R.A. (1985). The molecules of life. Scientific American, 253, 34-43.

Weintraub, H.M. (1990). Antisense RNA and DNA. Scientific American, 262, 34-40.

White, B.A. (1993). PCR Protocols - Current Methods and Applications, Methods in Molecular Biology, Vol. 15, Humana Press, New Jersey.

الباب الثانى
البعد الأول للتحسين الوراثى للنباتات : زيادة الإنتاجية والجودة

مقدمـــــــة وتقديم واجب :

بالرغم من تحديد مضمون هذا الكتاب من البداية فى اتجاه إيجاد الطـــرق والسـبل المناسبة من خلال التقنيات الحديثة للبيولوجيا والتكنولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية فـــى السيطرة على الآفات وتقليل الفاقد الذى تسببه مما ينعكس إيجابا فى زيادة الإنتاجية وتوفـير الطعام للأفواه الجائعة مع أقل قدر من السلبيات والتأثيرات غير المرغوبـــة علـــى البيئـة بشمولية مكوناتها إلا أن التحسين الوراثى للنباتات بصرف النظر عن الأساليب المتبعة لابـد وأن يساهم بشكل أساسى فى تحقيق أهداف المكافحة المتسنيرة للآفات .

ألم نقول فى كل المناسبات أن نجاح إنتاج نباتات سليمة صحية قوية يجعلها قـــادرة على تحمل الأضرار التى تسببها الآفات ؟ ألم تعقد مؤتمرات عديدة استهدفت القاء الضـــوء والتوعية بضرورة وأهمية وإيجابيات العمل على إنتاج نباتات صحية تتحمل الظروف البيئية المعاكسة من جفاف وملوحة ونقص الضوء ونقص الغذاء والآفـــات ؟ يـــا ســـادة الأمـــور متشابكة بل متداخلة والفن يتمثل فى كيفية تحقيق الانسجام والتناسق بين المدخلات المتعـددة المشتركة فى منظومة الإنتاج الزراعى . ماذا يعنى أن تعطينى نباتات شـــديدة الحساســية للإصابة بالذباب الأبيض ثم تقول لى أنها ذات إنتاجية عالية بينما نعانى نحن مـــن مشـــاكل خاصة بآفة الذباب الأبيض ؟ على الجانب الآخر ماذا يفيد أن أعطيتنى نبات يقاوم الآفـــات بينما إنتاجيته منخفضة أو ذات إنتاجية عالية مع جودة منخفضة ؟ هراء ... مـــا فـــائدة أن توفر لى صنف نباتى جيد الصفات عالى الإنتاجية ولكنه يحتاج الى مياه رى نقيـــة خاليـة تماما من الأملاح وأنت تعلم أن هذا مطلب مستحيل الأن وفى المستقبل ... هل ســـنضطر يوما لرى النباتات بمياه متعثرة الوجود ؟ يا للعجب تساؤلات عديدة ومتداخلة يحـــار فيـــها العقل والتصور العقلانى ولكنها السبيل الوحيد الباقى أمامنا بعدما دمرنا البيئـــة الزراعيــة والأصناف النباتية ذات الصفات الجيدة وبأيدينا لكى نشقى ...

الإنسان يضيق على نفسه بالرغم من اتساع أرض الله وتهيئتها للسعى فى مداركـــها دون حدود أو فواصل ولكن من أين الضيق ؟ أتى عندما وضـــع الإنســـان حـــدوداً وقســـم الأرض الى دولا متجاورة ومتباعدة تختلف فى ظروفها المناخية وتعداد البشـــر والمـــوارد الطبيعية مما أدى الى خلق المشاكل المتباينة بين البلدان والمنـــاطق . هـــا هـــى منـــاطق

صحراوية سائدة بلا أرض زراعية أو محدودة وأخرى غنية بالمساحات والموارد المائية وثالثة غنية بالثروات البترولية والمعادن ورابعة بالأسماك ... الخ . هكذا قال الشيخ الفاضل طيب الله ثراه العالم الجليل الشيخ محمد متولى الشعراوى فقد أضاف أنه إذا أزيلت الحواجز والحدود بين الدول لأنها جميعا أرض الله لن تكون هناك مشكلة لا فى المسكن أو الملبس أو الغذاء ولكنها طبيعة البشر والإنسان ... أليس واقعا أن تلقى الدول الغنية فائض المحاصيل فى المحيطات حتى لا تنخفض الأسعار ؟ ألم يحدث ذلك مع البن والأرز والذرة ... وغيرها ما نعلم وما لا نعلم ...؟ أية جرائم ترتكب فى حق الإنسان والإنسانية بسبب التوجهات الاقتصادية وغيرها مما لا نعرف له أسماء أو مبررات سوى ظلم الإنسان لأخيه الإنسان . لقد أصبح الاقتصاد والسياسة ... أهم العوامل التى تتحكم فى رزق وقوت الإنسان حيث لم تعد هناك نواحى إنسانية بل حل محلها الجشع . الواقع والتحدى لواقع ومستقبل البشرية يرتبط بالزيادة الرهيبة فى تعداد البشر والتى وصلت بتعداد سكان الكرة الأرضية لما يزيد عن ٦ بليون إنسان وتشير الاحصائيات والتنبؤات الى تضاعف هذا العدد بعد ٥٠ عاما . كيف يتسنى لنا إنتاج الغذاء والكساء لهذا الطوفان ؟ هل ننتظر حتى يجىء اليوم الذى يغتال الإنسان أخيه بالرغم من أنه واقع فى الوقت الراهن ؟ الأمر بمنتهى البساطة أو السذاجة تتمثل فى توقع مجابهة هذه المشاكل من خلال التوسع الأفقى فى الزراعة بمعنى زيادة مساحة الأرض الزراعية ... هذا ليس بالأمر السهل والثانى من خلال التوسع الرأسى أى زيادة إنتاجية الوحدة الأرضية أى محاولات إيجاد أصناف نباتية ذات إنتاجية عالية وهذا هو موضوع الساعة تحت مظلة التكنولوجيا الجزيئية والهندسية الوراثية لا تحقق إنتاجية متميزة فقط ولكن جودة عالية ومقدرة على تحمل الظروف المعاكسة بما فيها الآفات ...

تربية النباتات ما هى إلا تحسين وراثى بجميع المقاييس مهما تنوعت الأهداف ولكنها جميعا تلتقى على هدف عام الا وهو زيادة الإنتاجية وتحقيق صفات معينة تعطى ميزات محددة للصنف الجديد . هذا ليس معناه أن الحصول على صنف جديد يعنى نسيان الأصناف القديمة ولكن الاحتفاظ بها واجب فى كيان " بنك الأصول الوراثية " فقد يحتاج اليه البحاث فى أوقات لاحقة لأنه مازال يحتفظ بصفات قد تحتاج إليها مستقبلا فى استنباط أصناف جديدة . من هذا المنطلق كان التنسيق بين مربى النباتات وهو ليس عالم أو باحث واحد فريد التخصص ولكنه فريق عمل متنوع التخصصات والخبرات يعمل خلال منظمة متكاملة لتحقيق الحصول على صنف أو أصناف بالخصائص المطلوبة وهذا ليس بالشىء الهين أو البسيط فقد يستغرق الحصول على صنف ما سنوات وسنوات ومن ثم نقول أنه استثمار محفوف بالمخاطر حيث قد يفشل هذا الصنف الوراثى الذى أنفق عليه الملايين من

الدولارات بعد أول إدخال في السوق على نفس المنوال الذى قد يحدث لأى مركب كيميائى مبيد كان أو غيره من مدخلات الزارعة . لذلك كان من الضرورى حتى يتمكن القارىء من استيعاب الموضوع أن أشير فى عجالات وتلغرافات مختصرة الى أسس ومقاييس ومعايير التربية النباتية للتحسين الوراثى للأصناف وقد وجدت بغيتى فى كتاب أ٠د٠أحمد عبد المنعم حسن بعنوان " الأساس الفسيولوجي للتحسين الوراثى فى النباتات :" التربية لزيادة الكفاءة الإنتاجية وتحمل الظروف البيئية القاسية ، الصادر عن المكتبة الأكاديمية ، ١٩٩٥ .

التربية النباتية والتحسين الوراثى لزيادة الإنتاجية

ما دام النمو النباتى هو الأساس المحدد للإنتاجية كان من الضرورى وضع معيار للتعبير الكمى عن هذا النمو لذلك تم وضع ما يعرف بمعادلات النمو أو دلائل النمو وهى تستخدم فى تحليل ومعرفة أسباب الاختلافات بين السلالات . ترتبط هذه المعادلات بعوامل طبيعية وحيوية تتداخل مع بعضها البعض وقد تؤثر سلبا أو إيجابا على الإنتاجية ومنها : الطاقة الكلية الساقطة على النبات ، الطاقة الشمسية النافذة ، المحصول البيولوجى ، الوزن الجاف ، كفاءة اعتراض أو استقبال الضوء الساقط ، كفاءة امتصاص الطاقة الشمسية ، كفاءة الاستخدام ، كفاءة التحويل ، نسبة الانعكاس ، معامل احتجاز الضوء ، المحصول الاقتصادى ، المساحة الورقية الكلية ، الوزن النوعى للورقة ، فترة بقاء الأوراق فعالة فى البناء الضوئى ، المساحة النسبية للأوراق ، دليل مساحة الورقة ، معدل النمو النسبى ، معدل النمو المحصولى ، الكفاءة التمثيلية ، دليل الحصاد ، درجة الإنتاجية ... وغيرها . بعد استعراض هذه المعايير أحسست بالتقصير فى حق تلامذتى حيث أجريت العديد من الدراسات عن التأثيرات الجانبية للمبيدات حيث كنا نتناول القليل جدا من هذه المعايير وسوف أتداركها بإذن الله سبحانه وتعالى فى دراسات لاحقة إذا كان فى العمر بقية . لقد ركزت الجهود على أهمية دلائل النمو خاصة دليل الحصاد الذى يمثل المحصول الاقتصادى كنسبة مئوية من المحصول البيولوجى (الوزن الجاف) وهذا هو المعيار الذى تناولته فى الدراسة علاوة على بعض الصفات المورفولوجية الأخرى . كذلك تؤخذ الكفاءة التمثيلية كمقياس لمعدل البناء الضوئى مطروحا منه الفاقد بالتنفس . دليل مساحة الورقة قد يكون معيار ذات أهمية خاصة عند ربطه بمرحلة معينة من النمو النباتى .

إذا تكلمنا عن التربية والأساس الفسيولوجى للمحصول نشير الى أن الإنتاجية المحصولية لأى نبات تعتمد على أربعة عوامل رئيسية : معدل البناء الضوئى – معدل التنفس – معدل انتقال الغذاء من أماكن تصنيعه فى الأوراق الى حيث يستفيد منه النبات – نسبة الغذاء المجهز التى تنتقل الى الأجزاء الاقتصادية من النبات . لقد تم تناول ١٤ صفة مؤثرة تحدد الاختلافات بين صنف وآخر مثل حجم المجموع الجذرى ، معدل البناء

الضوئى فى وحدة المساحة ، طريقة حمل الأوراق ، مدة بقاء الأوراق تعمل بكفاءة فى البناء الضوئى ، معدل انتقال المواد الغذائية ، مساحة الأوراق فى وحدة المساحة ، المساحة الكلية لأوراق النباتات ، سمك الورقة ، معدل تبادل غاز ثانى اكسيد الكربون ، حجم الثغور ، مقاومة الميزوفيل فى الورقة لتبادل الغازات ، مدى توفر الانزيمات اللازمة لعملية البناء الضوئى ، معدل التنفس ، الاختلافات الوراثية فى الاستجابة للفترة الضوئية والحرارة والارتباع . هذا يعنى أن المحصول الاقتصادى يتأتى من محصلة ثلاثة نواحى : توافق النبات مع البيئة وقدرته على حصاد الضوء فى عمليات البناء الضوئى وقدرته على نقل الغذاء الى أماكن الإنتاج . يجابه المربى بتحديات كبيرة تتمثل فى كيفية الاستفادة من أكبر قدر ممكن من النواحى الفسيولوجية لاختيار الآباء التى يبدأ بها برنامج التربية فقد يكون سبب الإنتاجية العالية فى صنف ما زيادة المساحة الورقية وفى صنف آخر توزيع الضوء الساقط على المجموع الخضرى ودليل الحصاد فى صنف آخر وهكذا .

قد يتساءل البعض عن الصفات الفسيولوجية والمورفولوجية التى تشكل ما يعرف مجازا بالنبات المثالى iteotype وهل يوجد ما يعرف بالنبات المثالى وإذا كان موجوداً ما هى صفاته ؟ لقد أتفق بعد جدل طويل عدم وجود النبات المثالى وإنما توجد طرز أو نماذج بيولوجية . لقد قام الباحث Kalloo (١٩٨٨) بوضع قائمة بالجينات التى تتحكم فى صفات النمو الهامة فى عدد من محاصيل الخضر ومنها يمكن تصور الطرز البيولوجية المناسبة لكل منها بما يتناسب مع الظروف البيئية . لقد تناول أ.د. أحمد عبد المنعم حسن أهمية طبيعة نمو الغطاء النباتى والذى يؤثر فى كمية الغذاء التى يتم تصنيعها لكل وحدة من مساحة الأرض والصفات التى تتحكم فية يسهل تقديرها لأنها تتميز بدرجات توريث عالية (هذا هو الاتجاه الرئيسى فى محاولات الحصول على نباتات مقاومة لفعل الآفات من خلال الكشف عن الصفات المورفولوجية والفسيولوجية المسئولة عن هذه المقاومة) . النمو والغطاء النباتى تؤثران بشكل كبير على مقدار الطاقة الشمسية التى يكتسبها النبات خلال عملية البناء الضوئى ..؛ مزة أخرى كل شيء مردود الى الطاقة ... سبحانك يا قادر . لقد أشار الياس ومحمد ١٩٨٥ الى أن الصفات التى يجب توفيرها فى نباتات محاصيل الحبوب لجعلها مقاومة للرقاد قصر الساق وصلابتها ومرونتها وتوفر مجموع جذرى كثيف يثبت النبات فى التربة بصورة جيدة وهذه الصفات تؤدى الى مقاومة الأمراض والآفات التى تضعف الساق والجذور . على الجانب الآخر قد تكون صفة القزمية مطلبا هاماً فى بعض المحاصيل كما فى القمح والأرز لأنها أكثر صلاحية للحصاد الآلى ويزداد فيها دليل الحصاد ومن ثم تعطى محصول أعلى . بعد ذلك تجدر الإشارة الى ما يعرف بتشكيل أو هندسة أو معمار النباتات وهى ذات علاقة مباشرة بالمحصول كما فى الطراز ذو الأوراق القائمة والآخر ذو الأوراق الأفقية وقد أتفق على طراز نموذجى .

يتجه مربى النباتات الى الجمع بين الصفات المرغوبة الجيدة فى تركيب وراثى واحد يحقق الإنتاجية العالية والجودة المطلوبة . من المسلم أنه قد بذلت جهود كثيرة ومضنية فى سبيل تحسين المحاصيل الاقتصادية ففى الطماطم مثلاً تكاثفت الجهود لإنتاج أصناف تنضج مبكراً من خلال التبكير فى الازهار أو العقد أو نضج الثمار . يتركز اهتمام المربى على تحقيق ما يتعلق بالمحصول الكلى مباشرة وأما على مكونات هذا المحصول كل على حدة أو على الصفات الفسيولوجية التى يكون لها دور مباشر عن التأثير على المحصول . من أهم مكونات المحصول فى الطماطم عدد العناقيد الزهرية وعدد الأزهار بكل عنقود ونسبة العقد ومتوسط وزن الثمرة . للأسف الشديد فان درجة توريث المحصول منخفضة جداً . لقد وجدت اختلافات كبيرة بين أصناف الطماطم فى كفاءتها فى عملية البناء الضوئى وكذلك وجدت علاقة بين البناء الضوئى وبعض الصفات المورفولوجية والتشريحية والفسيولوجية فى الأوراق . فى البطاطس وجد أن صفة المحصول تتأثر بالتباين غير الاضافى للجينات ودرجات التوريث لبعض صفات مكونات المحصول مثل عدد الدرنات وحجم الدرنات عالية نسبيا . مثال آخر يتمثل فى أن حجم ثمرة الفلفل صفة كمية يتحكم فيها عديد من العوامل الوراثية تصل الى ٢٠ – ٢٣ . فى مشروع مشترك بين جامعة عين شمس (كلية الزراعة) وجامعة ميرلاند كوليج بارك بالولايات المتحدة الأمريكية يستهدف إلقاء الضوء عن العوامل المسئولة عن الإصابة أو المقاومة للآفات . يعمل الجانب المصرى على محاصيل القمح والفول البلدى والفراولة وفول المانج بينما يعمل الجانب الأمريكى على الفلفل الأخضر حيث يعانى هذا المحصول من الإصابة بأحد الحشرات الخطيرة التى تدخل من منطقة إتصال الثمرة بالساق . لقد وجد البحاث الأمريكان وجود علاقة بين مقاومة النبات لغزو هذه الحشرة مع مركب كيميائى هوالكابسيسين . لقد نجح الفريق البحثى فى تعظيم تواجد هذا المركب المسئول عن المقاومة من خلال تعريف وإدخال الجين الخاص بتواجده . من الصفات المحددة فى الخيار حالة الجنس والنسبة الجنسية ، طبيعة النمو ، من يريد تفاصيل أكثر عن جهود التربية لتحسين المحصول والأساس الفسيولوجى الرجوع الى Wollace (١٩٧٢) ، Foey (١٩٨١) ، Wilson (١٩٨١) وغيرها .

التربية لتحمل الظروف البيئية غير الملائمة

من المسلم به أن التربية النباتية هى الطريق الصحيح والمباشر للحصول على الأصناف ذات الصفات المرغوبة والتى تتلائم وتتكيف مع الظروف والعوامل البيئية غير الملائمة . لقد ورد فى خاطرى سؤال ماذا كان الوضع قبل ترسيخ مفاهيم وطرق التربية النباتية ؟ ألم تكن هناك أصناف برية فى أماكن ومناطق بل ودول مختلفة متباعدة يفصل

بينها حدود جغرافية بل ويوجد فيما بينها اختلافات بيئية رهيبة ؟ حتى لو كان لكل نبات مكان نشأ فيه فى البداية إلا أنه قد انتقل بوسيلة ما الى البيئات الجديدة وتأقلم فيها ذاتيا دون تدخل من أحد وإذا جاز لى التعبير لقد تربت هذه الأصناف ذاتيا أى ربانيا ... سبحانك ياقادر ... لكى يستوعب القارىء هذا التناول أود الإشارة الى تداخل العوامل البيئة فى التأثيرات التى تحدثها على النباتات . صحيح قد يكون هناك عامل بيئى محدد للنمو والإنتاجية وغيرها ولكنه لابد وأن يؤثر ويتأثر بالعوامل الأخرى الموجودة معه . تتفاوت استجابة النباتات المختلفة للعامل البيئى محل التناول بدرجات كبيرة بل توجد اختلافات فى استجابة أصناف النوع الواحد بل فى نباتات نفس الصنف . ألا تشير الأديان والشرائع السماوية الى الاختلافات بين البشر فى كل شىء ؟ ألا توجد اختلافات عن التعبير تم كل فرد بما يعرف " بالبصمة " لذلك كل ما يجرى من دراسات فى البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية يتمثل فى تعظيم صفة معينة أو بصمة أو عدة صفات فى النبات المرغوب لحل مشكلة معينة خاصة بالاستجابة للظروف المعاكسة أو لزيادة الإنتاجية . فى هذا المقام أود التذكرة ببعض الاصطلاحات الخاصة بالاستجابة مثل الحساسية (أصناف حساسة – أصناف متحملة – أصناف مقاومة – أصناف ذات تحمل فائق ...) التأقلم adaptation يحدث عند زراعة صنف ما فى مكان ما لا يلائم الصنف وأود التوضيح أنه لا مكان للتأقلم فى برامج التربية النباتية بهدف الحصول على طرز وراثية تقاوم الظروف البيئية المعاكسة والتأقلم قد يكون فسيولوجيا أو وراثى طبيعى والأخير يحدث بواسطة الانتخاب الطبيعى الذى يبقى على الطفرات الأكثر تحملا للظروف البيئية . يتبقى اصطلاح المناعة وأنا شخصيا لا أعتقد بإمكانية إيجاد صنف منيع لعامل ما ... ولو أن العلماء يقولون أن المناعة تعد أكثر شيوعا فى الطبيعة من المقاومة حيث لا يوجد نبات واحد قابل للإصابة بجميع مسببات الأمراض والآفات المعروفة ولكن كل نبات لا يصاب سوى بعدد محدود للغاية من بين الآفات المتوفرة فى الطبيعة .

مفاهيم القابلية للإصابة والمقاومة والمناعة لا تصلح للاستعمال فى مجال التربية النباتية لتحمل الظروف البيئية المعاكسة حيث يتساءل البحاث عن ماهية التطفل والتكاثر وما هى تقنيات الدفاع فى النباتات ضد الآفات والظروف البيئية الأخرى . هناك أمور يحار العقل فى فهمها كأن تجد نباتات تقاوم الملوحة وأخرى تقاوم الحرارة وثالثة لمبيدات الحشائش ورابعة لآفات التربة . ماذا يقول العقل عندما تجد نباتات ميتة فى وسطها نبات قائم بحالة نمو ممتازة ؟ ماذا يقول الإدراك الإنسانى فى حالة عدم تأثر نبات ما بآفة ما قضت على كل أقرانه فى نفس المنطقة وتحت نفس الظروف البيئية . لذلك اتفق بعد نقاش طويل أن أفضل مصطلحات للتعبير عن استجابة النباتات للظروف غير الملائمة هما الحساسية والقدرة على التحمل وهما درجتان على نفس المقياس .

لكى تحقق برامج التربية النباتية أهدافها لابد أن تتبع طرق تقييم قياسية متفق عليها تتميز بالسهولة وقلة الجهد والتكاليف اللازمة لإنجاز المهام المنوطة بها بسبب العدد الهائل من لنباتات التى تخضع للتقييم . من المعروف أن لكل طريقة درجة معينة من الدقة والتكرارية ولكن هناك حدوداً ومعايير معينة تفي بغرض التقييم للحكم على مقاومة أو تحمل أو حساسية صنف بناتى ما للعامل أو العوامل البيئية مجالا الدراسة والتربية . هناك طرق تقييم مباشرة مثل تقييم المحصول في الحقل مباشرة تحت الظروف القاسية لاستيضاح درجة التحمل لها ، إجراء التقييم فى الصوبات والبيئات المحمية أو إجراء التقييم فى المعامل تحت ظروف متحكم فيها وهناك التقييم من خلال مزارع الأنسجة أو التقييم بمعاملات خاصة للدلالة على مدى تحمل الانحراف فى عوامل بيئية معينة . من أهم مميزات التقييم عن طريق مزارع الأنسجة إمكانية التحكم فى العوامل البيئية وإمكانية تقييم عدد كبير من الخلايا فى ظروف تامة التجانس وغياب التباينات فى الصفات المعنية التى ترجع الى اختلافات مورفولوجية وكذلك إمكانية دراسة الأساس الفسيولوجى المقيمة على المستوى الخلوى .

لابد أن يكون للتربية النباتية فى مجال تحمل الظروف البيئية المعاكسة أهداف محددة وواضحة لابد أن يضعها المربى فى وجدانه فى كل لحظة يتعايش معها ويحلم بها لدرجة أنها تسيطر على كيانه كله . من هذه الأهداف ما يتعلق بإنتاج نبات صحى سليم قوى يستطيع أن يتحمل الظروف المعاكسة بما فيها الإصابة بالآفات . من أهم الأهداف التى يعمل مربى النباتات على تحقيقها : تحمل التغيرات الحادة فى درجات الحرارة – الاستجابة للفترة الضوئية السائدة – تحمل المستويات العالية من الأملاح فى التربة ومياه الرى – تحمل الجفاف – القدرة على النمو فى الأراضي الغدقة – تحمل التغيرات الحادة فى درجة حموضة التربة – القدرة على النمو فى وجود مستويات قليلة من الغذاء – تحمل المبيدات – تحمل الإصابة بالآفات التى توجد فى التربة وعلى المجموع الخضرى – تحمل ملوثات الهواء والماء وغيرها . النمو النباتى منظومة محكومة بقوانين سماوية يحار العقل فى تصورها لأنها من قدرة الخالق سبحانه وتعالى . بالطبع لن يكون من مهام مربى النبات تحقيق كل هذه الأهداف والعمل عليها جميعا فى وقت واحد لأن هذا محال ولا يكلف الله نفساً إلا وسعها ... هناك عامل أو أكثر محددان لمنظومة الإنتاج النباتى والتحمل للظروف المعاكسة يعمل الباحث والمربى على تعظيم تواجدها وتوريثها وكل هذا يستلزم وقتا وجهداً مضنياً وقد يتعرض الباحث للفشل مرات عديدة ولكن عليه أن يتجنب الوصول لحالة الإحباط واليأس لأن الله سبحانه وتعالى لا يضيع أجر من أحسن عملاً . السؤال الآن هل النباتات الناتجة من التربية والتى تتحمل ظروف ما آمنة على المستهلك والبيئة ؟ يهتم المربى كذلك بتحسين نوعية البذور حيث أنها أعضاء التكاثر بما يجعلها تتحمل الظروف

القاسية أثناء الإنبات فقد تكون الأهداف فى هذا الصدد تحقيق الإسراع فى الإنبات حتى تفلت من الظروف المعاكسة أو زيادة قدرتها على الإنبات فى الحرارة غير المناسبة . لقد تأكد على سبيل المثال أن سرعة إنبات بذور الطماطم صفة وراثية يكون فيها أغلب التأثير الجنينى إضافى وتتأثر بالتركيب الوراثى للأم وترتبط إيجابيا بوزن البذرة .

تجرى العديد من الاختبارات خلال وأثناء برامج التربية النباتية للحصول على سلالات قادرة على تحمل درجات الحرارة غير المناسبة . بالنسبة للحرارة المنخفضة تجرى اختبارات القدرة على الإنبات وتحمل الصقيع والقدرة على العقد ... هذا مع البذور أما فى حالة اختبارات نموالنباتات فى الحرارة المنخفضة مدى استشعاع (فلوريسينية) الكلوروفيل . لقد أظهرت الأبحاث أن ميكانيكية مقاوة النباتات للبرودة تعتمد على بطء تحلل الكلوروفيل عند التعرض لحرارة الليل القارسة وسرعة تعويض الكلوروفيل المفقود منها ليلا بمجرد تعرضها لضوء النهار . عقد الثمار من العوامل المحددة للإنتاجية الجيدة وملائمة الصنف النباتى للزراعة فى درجات الحرارة المنخفضة ولو أننى أعانى شخصيا من قلة عقد الثمار فى الموالح ليس بسبب الحرارة ولكن بسبب عدم انتظام الرى . لقد تمكن البحاث من عزل انزيمات متماثلة فى نشاطها وتأثيرها ولكنها مختلفة فى شحنتها الكهربائية ترتبط مباشرة بالقدرة على العقد فى درجات الحرارة المنخفضة . لقد وجد أن وراثة القدرة على العقد فى الحرارة المنخفضة صفة مندلية بسيطة متنحية . فى مجال تحمل الحرارة المرتفعة تقسم النباتات الراقية الى نباتات وسطية وأخرى متوسطة التحمل كما أن الأضوار التى تحدثها الحرارة المرتفعة قد تكون بسيطة أو متوسطة أو شديدة . الأخيرة تتمثل فى حدوث تفاعلات كيميائية معينة تؤدى الى موت الأعضاء النباتية حتى المنخفضة الرطوبة منها مثل البذور . لقد أظهرت البحوث والدراسات الخاصة بالأساس الفسيولوجى لتحمل الحرارة العالية الدور الكبير لتمثيل حامض الكراسيولاسيان وكذلك الاختلافات فى مدى ثبات انزيم "RuBp carboxylase" فى ظروف الحرارة العالية وكذلك كفاءة تمثيل الغذاء المجهز بها وانتقاله الى الأعضاء الأكثر تأثيراً بالحرارة العالية . هناك طرق عديدة لتقييم التحمل للحرارة العالية مثل قياس درجة التسرب الأيونى (قياس الزيادة فى درجة التوصيل الكهربائى) وقياس مدى تأثير الحركة الدورانية للسيتوبلازم بالحرارة العالية وكذلك قياس مدى تأثير معدل البناء الضوئى بمعاملة التعريض للحرارة وقد حدث تقدم مذهل وتطور فى أجهزة القياس حيث يمكن تشغيلها فى الحقل تحت الاختبار والحصول على النتائج فى وقت قصير للغاية .

الفترة الضوئية من العوامل الهامة والمحددة للنمو النباتى الجيد ومن ثم الإنتاجية الجيدة حيث أن معظم النباتات لا تناسبها الفترة الضوئية الشديدة القصر لأنها لا تتمكن من

تصنيع ما يكفيها من الغذاء تحت هذه الظروف . السؤال المطروح فى هذا الصدد العلاقة بين النواحى الوراثية والاستجابة للضوء . ليكن معلوما أن العديد من النباتات لا تستطيع التزهير وإنتاج المحصول الاقتصادى والبذور إلا إذا توفرت لها فترات ضوئية بطول معين (حسن ، ١٩٨٨) . بالطبع تختلف أصناف وسلالات النوع الواحد فى استجابتها للضوء وقد أدى هذا الى إمكانية زراعة أصناف معينة تحت ظروف ضوئية معينة وزراعة أصناف أخرى تحت ظروف ضوئية مختلفة . تتمثل مهمة مربى النبات فى جعل النبات يفقد حساسيته للضوء بحيث يتمكن من الازهار والنمو الاقتصادى فى جميع الفترات الضوئية التى يتعرض لها . لقد أظهرت البحوث والدراسات أن صفة الحساسية للفترة الضوئية فى النباتات الزهرية يتحكم فيها جين واحد أو عدد قليل جدا من الجينات . يعتقد البعض بوجود هورمون للأزهار يسمى فلوريجين وآخر مضاد للازهار يسمى أنتيفلوريجين يتحكمان فى استجابة أو عدم حساسية النباتات للفترة الضوئية (سبحانك يا قادر الداء والدواء معا) وهناك من يعتقد أن عدم إنتاج مواد مثبطة للازهار أو استبعادها يؤدى الى جعل النبات محايد للفترة الضوئية . لقد حدث تقدم كبير فى تربية الأصناف النباتية فى الفاصوليا والخيار والبطاطس والشليك وغيرها بما يؤدى الى تحييد تأثير الضوء ومن ثم يمكن زراعتها فى مختلف الظروف والبيئات ذات الاختلاف فى الفترة الضوئية .

الملوحة فى الأراضى خاصة حديثة الاستزراع تعد من المشاكل الحادة فى الوقت الحالى وهى واحدة من أربعة مشاكل قد توجد معا وفى نفس الوقت : الملوحة الأرضية ، الرطوبة الأرضية ، العناصر الغذائية فى التربة ، درجة حموضة التربة . ومجابهة هذه المشكلة المركبة تتمثل فى إصلاح التربة أو زراعة أصناف نباتية برية تتحمل هذه الظروف المعاكسة ومحاولة استئناسها وكذلك تربية نباتات تتحمل البيئة الأرضية غير المناسبة . المشكلة حادة فى المناطق قليلة الأمطار والتى تعتمد على الرى فى الزراعة مما يؤدى الى تراكم الأملاح بسبب عدم الغسيل . تؤثر الملوحة على تركيب وخصائص التربة وتصعب من امتصاص الجذور للماء والعناصر الغذائية وزيادة تركيز الأملاح فى داخل النبات وهذا يؤدى الى تثبيط النشاط الأيضى والتضارب مع تمثيل البروتين وفقد الخلايا للماء وقفل الثغور وحدوث الشيخوخة المبكرة للأوراق . المهم أن حدوث خلل فى التوازن بين تركيز الأملاح فى السيتوبلازم والفجوات العصارية يؤدي الى زيادة أضرار الأملاح للنبات . هناك نباتات محبة للملوحة بعضها يعيش فى مياه البحر والأخرى فى اليابسة فى تركيزات لاتقل عن ٤٠ ألف جزء فى المليون (التوصيل الكهربى Ec = ٦٢,٥ مللميوز) . يحاول الإنسان الاستفادة من النباتات المحبة للملوحة فى التغذية أو تجهيز الأعلاف . لقد حاولت الاستفادة فى مزرعتى الخاصة فى منطقة الخطاطبة بزراعة نباتات الهوهوبا والذى يحصل

منه على دهون عالية الجودة ذات استخدامات كثيرة فى الصناعة وهـــذا النبــات يتحمــل الجفاف والملوحة بشكل كبير . لقد أظهرت الأبحاث وجود خطوط دفاع فى النباتات ضــــد الكميات العالية من كلوريد الصوديوم مثل : فصل النباتات لأيونات الصوديوم عن الكلـــور عند امتصاص الماء الأرضى الملحى ، حجز الأملاح فى الفجــوات العصاريــة ، وجــود تراكيب متخصصة لفرز وطرح الأملاح منها كما فى النجيليات المحبة للملوحــة ، اســقاط الأوراق عند زيادة محتواها من الأملاح ، العمل على التوازن الأسموزى من خـــلال نقـل أيون ثالث خارج الخلية وبعض النباتات تستطيع استبعاد أيون الكلور أو أيون الصوديــوم أو كليهما من الوصول الى النموات الخضرية من خلال نظم طبيعية كيميائية خاصة . التحمـل للملوحة ليست صفة بسيطة وإنما محصلة عدة صفات تعتمد على أسس وراثية فســيولوجية مختلفة . عند تقييم النباتات للملوحة بزراعتها فى وسط ملحى قد يترتب عليه إظهار بعــض الصفات المورفولوجية وليكن معلوما أن عدم ظهور تباينات مورفولوجية ظاهرية لا يعنـــى عدم وجود تباينات وراثية مختلفة يجب التعرف عليها وجمعها فى تركيب وراثى واحـــد . يمكن تقييم الملوحة من خلال علاقتها بالنمو النباتى وكذلك تقييم خاصية تراكــم المركبــات العضوية الذائبة أو الرى بمياه البحر لمعرفة مدى تحمل النباتات للملوحة . لقد أتفق علــــى معايير الحكم على الملوحة مثل معدل تشرب البذور بالماء ، نسبة الإنبات ، سرعة الإنبات، نمو البادرات .... وغيرها .

تجرى تجارب تقييم تحمل الملوحة فى مزارع الأنسجة ويتميز بســـهولة وتجــانس إجراء الاختبارات وسهولة التعامل مع الخلايا الفردية ومعرفة الأساس الفسيولوجى لتحمــل الملوحة ووجود فرصة كبيرة لنشوء اختلافات وراثية فى مزارع الأنسجة ويفيــد اســتخدام مزارع الخلايا الحية فى اكتشاف الطفرات المتنحية التى تتحمل الملوحة . من أهم العيــوب فى هذه الطريقة أن طبيعة تحمل الملوحة فى سلالات الخلايا قد تختلف عما قد يحدث فـــى النباتات الكاملة . أظهرت الدراسات تحكم جين واحد منتج فى صفة الحساســـية لكلوريــد الصوديوم فى فول الصويا وهنا جين آخر فى الفلفل وهناك طفرة فى نبـــات أرابيدوبســيس تؤدى الى انخفاض الضغط الأسموزى للخلايا ومن الذرة توجد طفــرة فيــها نقــص فــى البرولين.

فى مجال التربية النباتية لتحقيق التحمل للرطوبة الأرضية غير المناسبة زيـــادة أو نقصانا توجد مصطلحات مقاومة الجفاف ، تجنب الجفاف ، تحمل الجفاف (هذا فى حالـــة تحمل نقص الرطوبة الأرضية) . يرجع تحمل النباتات للجفاف الى قدرتها على تأخير فقـد الرطوبة من الأنسجة أو تحمل الفقد الرطوبى عند حدوثه . هناك خفض معـــدل النتــح أو زيادة معدل امتصاص الماء . تحمل النبات للجفاف يحدث من خلال التنظيــم الأســموزى

لخلايا النبات . الفقد الرطوبى ومعدل البناء الضوئى تحت ظروف الجفاف يدخل فى معادلة حساب المحصول البيولوجى أو الاقتصادى ودليل الحصاد . يجدر بنا التمييز بين تجنب الجفاف وتحمل الجفاف . الافلات من ظروف الجفاف يتحقق بالإنبات السريع للجذور عقب المطر واستكمال دورة الحياة من نمو وتزهير واثمار فى فترة وجيزة جدا وكذلك ما يحدث فى النباتات الصحراوية من تكوين طبقة سميكة من الشمع على كل الأسطح النباتية تمكنها من خفض درجة النتح وقلة عدد الثغور بالأوراق وكبر الفجوات العصارية مع تراكم المركبات العضوية الذائبة فى السيتوبلازم وتشعب المجموع الجذرى . من أهم الصفات التى تؤثر فى قدرة النبات على تحمل نقص الرطوبة الأرضية إنبات البذور ، نمو البادرات ، التبكير فى النضج ، النمو الجذرى ، الزاوية التى تصنعها الورقة مع الساق ، أديم الورقة وشعيراتها ، حجم الخلايا ومعدل النمو ، كثافة الثغور وسلوكها ، مخزون الماء فى الجدر الخلوية ، تحول الأغشية الخلوية لأضرار الجفاف ، التنظيم الاسموزى ، معدل البناء الضوئى ، تراكم انزيمات معينة . بالإضافة الى عوامل تقييم تحمل ظروف الجفاف ، الحساسية لاحتراق الأوراق ، التفاف الأوراق ، درجة حرارة الأوراق ، كثافة وتشعب المجموع الجذرى ، الانتخاب لصفة المحصول ، الانتخاب فى مزارع الأنسجة .

على الجانب الآخر يؤدى ارتفاع الرطوبة الأرضية أو ما يطلق عليه غدق التربة الى نقص نمو الجذور والأضرار بالمجموع الخضرى ونقص المادة الجافة وضعف المحلول بسبب سرعة استهلاك الاكسجين الموجود فى التربة بسبب تنفس جذور النباتات وكائنات التربة الدقيقة . نقص الطاقة الميسرة للجذور يؤدى الى نقص امتصاص الماء والعناصر الغذائية وانتقالها فى النباتات وخلل النشاط التمثيلى يؤدى الى خلل فى التوازن الهرمونى فى النمو القمى وتمثيل الهورمونات . يؤدى التنفس اللاهوائى الى زيادة تركيز العناصر مثل الحديد والمنجنيز الى مستويات سامة وتراكم بعض الأحماض العضوية وإحداث خلل فى الأغشية الخلوية . تنشط عمليات تحول الأزوت العضوى الى الصورة الغازية مما يؤدى الى ظهور أعراض نقص النتروجين . تتميز النباتات التى تتحمل الماء الأرضى العالى بزيادة المسافات البينية فى نسيج القشرة وتكوين جذور عرضية قريبة من سطح التربة واللجوء الى بدائل لمسارات التحولات الكيميائية الحيوية الخاصة بالتنفس وزيادة كفاءة النباتات فى الاستفادة من النترات كمستقبلات للالكترونات . تختلف الأنواع المحصولية كثيرا فى مدى تحملها لظروف عذق التربة فهناك المحاصيل الحساسة للعذق (طماطم – شعير – خوخ – مشمش) ومحاصيل متوسطة التحمل (البرقوق) ومحاصيل تتحمل عذق التربة (الذرة – التفاح) . لقد نجحت برامج التربية فى إنتاج نباتات تتحمل

عذق التربة مثل الأرز الطافى والطماطم والفاصوليا وغيرها ومازال المجال مفتوحا لمزيد من الدراسات .

هناك التربية لتحمل زيادة العناصر فى التربة أو نقصها وهذه ترتبط بشكل مباشر بانخفاض الرقم الايدروجينى للتربة فى الأراضى الحامضية . عند انخفاض الحموضة عن (٥) تظهر تركيزات عالية من الالومنيوم والحديد والمنجنيز مما يحد من قدرة النباتات على النمو بينما فى الأراضى ذات الحموضة العالية يحدث نقص فى الحديد والزنك والمنجنيز لذلك كان لزاما على كل من يعمل فى المناطق الصحراوية الجافة وشبه الجافة مراعاة هذا العامل . لقد تحققت نجاحات فى الحصول على أصناف نباتية من القمح والذرة والشعير والطماطم تتحمل التركيزات العالية من الألومنيوم وحدث نفس الشيء بالنسبة للمنجنيز مع نباتات البرسيم وفول الصويا والخس . الاختلافات الوراثية بين النباتات تحدد مدى كفاءة النبات فى امتصاص وتحمل نقص العناصر المغذية فى التربة وقد حقق مربى النباتات تقدم فى تربية الذرة وفول الصويا والأرز والفاصوليا والشوفان والطماطم وقد ثبت أن هذه الصفة يتحكم فيها عدد قليل من الجينات . حيث أن الفوسفور لا ينتقل فى التربة لذلك كان تغلغل المجموع الجذرى فى التربة حتى يتمكن من الامتصاص هو العامل المحدد . أثناء التربية قد تنتج طفرات طبيعية غير قادرة على تحمل النقص فى العناصر الغذائية فى التربة ولكن يمكن الاستفادة منها فى إنتاج أصناف أكثر تحمل لتلك الظروف . هناك تربية نباتية تستهدف زيادة الكفاءة الوراثية فى الاستفادة من الأسمدة وقد حدث تقدم كبير فى مجال تربية القمح والأرز والسورجم والقطن . يهتم مربى النباتات بدراسة وراثية القدرة على المعيشة التعاونية مع بكتريا العقد الجذرية خاصة فى بعض أصناف البرسيم وفول الصويا والبسلة وهى صفات وراثية يتحكم فيها عدد من الجينات . تأخذ دراسات الهندسة الوراثية فى مجال التربية لزيادة الاستفادة من بكتريا الجنس رايزوبيم التى تقوم بتثبيت آزوت الهواء الجوى فى جذور البقوليات مسارات ثلاثة : نقل الجينات المسئولة عن تثبيت الهواء الجوى الى النباتات مباشرة ، نقل الجينات المسئولة عن العقد الجذرية الى نباتات أخرى غير بقولية، زيادة كفاءة البكتريا فى تثبيت آزوت الهواء الجوى .

هناك التربية لتحمل ملوثات البيئة ففى الهواء غاز ثانى أكسيد الكبريت والأوزون والغازات وأبخرة الكلور والأمونيا وثانى أكسيد النتروجين وغيرها وليسمح لى أ٠د٠ أحمد عبد المنعم حسن فى أخذ الجدول الخاص بتقسيم محاصيل الخضر حسب حساسيتها للمركبات التى تلوث الهواء الجوى " والمذكور فى كتاب سيادته " الأساس الفسيولوجى للتحسين الوراثى فى النباتات " التربية لزيادة الكفاءة الإنتاجية وتحمل الظروف البيئية القاسية " والصادر عن المكتبة الأكاديمية ، ١٩٩٥ .

جدول (٢-١) : تقسيم محاصيل الخضر حسب حساسيتها للمركبات التى تلوث الهواء الجوى

المركب	الخضراوات: حساسة	متوسطة	قادرة على التحمل
الأوزون	الفاصوليا – البروكولى – البصل – البطاطس – الفجل – السبانخ – الذرة السكرية – الطماطم – القاوون	الجزر – الهندباء – البقدونس – الجزر الأبيض – اللفت	البنجر – الخيار – الخس
ثانى اكسيد الكبريت	الفاصوليا – البنجر – البروكولى – كرنب بروكسل – الجزر – الهندباء – الخس – البامية – الفلفل – القرع العسلى – الفجل – إالروبارب – السبانخ – الكوسة – البطاطا – السلق السويسرى – اللفت	الكرنب – البسلة – الطماطم	الخيار – البصل – الذرة السكرية – الكرفس
الفلور	الذرة السكرية		الأسبرجس – الكوسة – الطماطم
PAN	الفاصوليا – البنجر – الكرفس – الجزر – الهندباء – الخس – المسترد – الفلفل – السبانخ – الذرة السكرية – السلق السويسرى – الطماطم	الجزر	البروكولى – الكرنب – القنبيط – الخيار – البصل – الفجل – الكوسة
الإيثيلين	الفاصوليا – الخيار – البسلة – اللوبيا – الجزر – الكوسة – البطاطا – الطماطم	الجزر – الكوسة	البنجر – الكرنب – الهندباء – البصل – الفجل
الكلور	المسترد – البصل – الفجل – الذرة السكرية	الفاصوليا – الخيار – اللوبيا – الكوسة – الطماطم	الباذنجان – الفلفل
الأمونيا	المسترد		الطماطم

بالطبع هناك تقسيمات أخرى كثيرة تشمل محاصيل الفاكهة والمحاصيل الحقلية كذلك يمكن الاستفادة منها فى برامج التربية حيث لابد ان تكون الأهداف واضحة ولو أنه يمكن استغلال الغازات فى تحقيق مزايا خاصة بسرعة الانضاج وغيرها .

لقد أسفرت جهود تربية النباتات فى الحصول على أصناف نباتية تتحمل ملوثات الهواء خاصة الأوزون فى الطماطم والخيار والفاصوليا والبصل والذرة السكرية . هناك مجهودات ضخمة للحصول على نباتات تتحمل ملوثات التربة من خلال تقليل كفاءتها فى امتصاص هذه الملوثات أو تعظيم دورها فى تحويل وتمثيل هذه الملوثات بعد الامتصاص الى مركبات غير ضارة . من أهم الانجازات نجاح مربى النباتات فى الحصول على نباتات تتحمل مبيدات الحشائش .

قبل العمل فى أى برنامج تربية نباتية لتحمل مبيد حشائش معين فى محصول معين يجب أخذ عدة محددات فى الاعتبار منها : أن يكون المبيد ذات مدى فعالية واسع ضد عدد كبير من الحشائش ، العلاقة بين الجرعة والاستجابة ، مدى تحمل المحصول وراثيا للمبيد، اجراء تقييم أولى لاختيار الآباء المناسبة لبدء برنامج التربية ، تجنب اختيار المبيدات ذات التأثيرات الضارة على الإنسان ، الحرص على تحقيق الصفات المحصولية المطلوبة . هناك طرق عديدة لتقييم تحمل الأصناف المرباه لمبيد الحشائش تحت الدراسة وتشمل التقييم الحقلى أو فى البيوت المحمية أو فى مزارع الأنسجة . لقد تحققت نجاحات فى الدخان ومبيد بيكلورام والباراكوات والبنتازون . لقد استخدمت تقنية دمج البروتوبلازم لنقل صفة تحمل مبيد الترايازين التى تورث سيتوبلازميا وتتوفر فى عديد من الحشائش ونقلها الى المحاصل الحقلية القريبة منها كما فى جدول (٢-٢) . لقد اتضح تحمل بعض أصناف سورجم الحبوب لمبيد الحشائش بروبازين ويتحكم فى هذه الصفة السائدة جين واحد . كانت مقاومة السورجم لمبيد ٤,٢-د سائدة وبسيطة . اتضح أن صفة تحمل الذرة لمبيد الحشائش ديكلوفوب – مثيل كمية وتورث بنسبة ٩٥% بينما كان تحمل الكتان للاترازين كمى ويورث بنسبة ٣٠% فقط . كانت صفة تحمل فول الصويا لمبيد المترابوزين بسيطة وسائدة . يمكن تحقيق التحمل الوراثى لمبيدات الحشائش من خلال :

١-كثرة إنتاج الخلايا لبروتينات معينة من تلك التى تتأثر بفعل المبيد مثل الانزيمات التى تتأثر بالجليفوسات .
٢-حدوث طفرات فى بروتينات معينة من تلك التى تتأثر بالمبيد كما فى حالات المقاومة .
٣-نقل جينات قادرة على الغاء سمية المبيدات من البكتريا الى النبات من خلال الهندسة الوراثية .

جدول (٢-٣) : أنواع الحشائش القادرة على تحمل الترايازين والأنواع المحصولية التي يمكن نقل تلك الصفة إليها

العائلة	نوع الحشائش	الأنواع المحصولية الهامة القريبة منها
Amrantaceae	٤ أنواع من الجنس Amaranthus	لايوجد
Caryophyllaceaae	Stellaria media	لايوجد
Chenopodiaceae	Atriplex patulla	بنجر السكر وبنجر المائدة
	٤ أنواع من الجنس Chenopodium	
	Kochia scoparia	
Compositae	Ambrosia artemisiiffolia	دوار الشمس -- القرطم – الطرطوفة
	Bidens triparita	
	Erigeron canadensis	
Cruciferaeae	Senecio vulgaris	
	Brassica campestris	لفت الزيت – اللفت – الكرنبيات
Graminae	Bromus tectorum	الحبوب الصغيرة – الأعلاف النجيلية – بنجر السكر
	Poa annua	
Polygonaceae	نوعان من الجنس Polygonum	الحنطة السوداء
Solanaceae	Solanum nigrum	البطاطس – الطماطم – الباذنجان – التبغ

تجرى دراسات واسعة للاستفادة من نظام الجلوتاثيون – إس – ترانسفيريز لإنتاج نباتات ذرة من خلال الهندسة الوراثية قادرة على تحمل مبيدات الاترازين والميتولاكلور والألاكلور . لقد بذلت جهود كبيرة لزيادة القدرة على تحمل مبيدات الحشائش فى عدد من المحاصيل الزراعية كما فى الجدول (٢-٤) . لقد وجد أن مبيدات الحشائش تؤثر على النباتات من خلال تأثيرها فى البلاستيدات الخضراء أو الميتوكوندريا أو تمثل الأحماض النووية أو البروتينات أو من خلال التأثير على الأغشية الخلوية . لذلك يتطلب إنتاج نباتات تتحمل مبيدات الحشائش من خلال الهندسة الوراثية الالمام بالأساس الجزيئى لكيفية إحداث المبيدات لهذه التأثيرات . فى البداية تجرى محاولات مضنية لمعرفة مكان وكيفية فصل المبيد وعلاقته بالنظم الحيوية المختلفة وبعد ذلك تبدأ مرحلة هندسة الحصول على نباتات تقاوم فعل المبيد بتعظيم التقنية الخاصة بالمقاومة . فالجليفوسات على سبيل المثال يؤثر على النظام الانزيمى (EPSP) وهو انزيم رئيسى فى مسار تمثيل الأحماض الأمينية العطرية خاصة فى البلاستيدات الخضراء . فى البداية أمكن عزل سلالة خلايا من البيتونيا قادرة على تحمل المركب والتى تحتوى على كميات كبيرة من انزيم EPSP بحيث يحدث مفعولة مع الجليفوسات .

جدول (٢-٤) : قدرة بعض المحاصيل على تحمل مبيدات الحشائش

المحصول	مبيد الحشائش	طريقة التربية
الذرة	الأترازين Atrazine	–
الكتان	الأترازين	–
السورجم	البروبازين Propaz	–
فول الصويا	المتريبوزين Metribuzin	–
لفت الزيت Brassica napus	السيمازين Simazine	–
	الترايازين Triazine	الانتخاب المتكرر وكذلك نقل المقاومة من B.campestris
Agrostis tenuis	الأميترول Amitrole	الانتخاب المتكرر
A.stolonifera	الأميترول	الانتخاب المتكرر
Ferstuca ruba	الاميترول	الانتخاب المتكرر
F.arundinacea	الترايازين	الانتخاب
الزوان المعمر Ryegrass	الأميترول	الانتخاب المتكرر
	الباراكوات Paraquat	الانتخاب المتكرر
	الجلايفوسيت Glyhphosate	الانتخاب المتكرر
الطماطم	الدايفناميد Diphenamide	إحداث الطفرة
Trifolium repens	الباراكوات	الانتخاب
القمح	الباراكوات	التقييم
	الترايازين	التقييم
	الترايازين	إحداث الطفرة
الكرنب	الترايازين	الانتخاب
المسترد الأبيض White Mustard	الترايازين	الانتخاب المتكرر
قرن الغزال Bird's – foot trefoil	2,4-D	الانتخاب المتكرر

المراجع

- حسن أحمد عبد المنعم (١٩٩٥) : الأساس الفسيولوجي للتحسين الوراثي في النباتات ، التربية لزيادة الكفاءة الإنتاجية وتحمل الظروف البيئية القاسية . المكتبة الأكاديمية للنشر والتوزيع – القاهرة – ٣٢٨ صفحة .

الباب الثالث
الاقترابات الجزيئية للحصول على كيميائيات لحماية المزروعات

مقدمـــــــة :

المواد والكيميائيات التى تستخدم فى حماية المزروعات تلعب دوراً حيويا فى تحقيق الإنتاجية العالية للمحاصيل الغذائية ومن ثم تظل وتستمر الحاجة للحصول علـــى مركبـــات جديدة . لقد أدت مشاكل مقاومة الآفات لفعل المبيدات ووضع مزيد من القيود الصارمة على تسجيل المبيدات وتفاقم العديد من المشاكل البيئية الى سحب بعض المبيدات التقليدية القديمـة من الأسواق ومن ثم برزت الحاجة الى ضرورة احلالها بمركبات أخرى ذات مواصفـــات خاصة تحقق أهداف حماية المزروعات دون مشاكل بيئية . من المســلم بـــه أن العمليـــات الزراعية تتغير باستمرار مما يخلق مشاكل جديدة والتى يصعب حلها من خلال المركبـــات المتاحة بالرغم من حقيقة وجود ما يزيد عن ٧٠٠ مادة فعالة موجودة فى كتـــاب التعريـــف بالمبيدات Pesticide manual (Worthing and Hence , 1991) . أن اكتشاف مركب كيميائي جديد فى مجال الزراعة من الأمور المكلفة جدا والتى تستغرق وقتا طويلا لا يقـــل في المتوسط عن ٨ سنوات وبتكلفة من ٢٠ – ٦٠ مليون جنيها استرلينيا بالإضافـــة الـــى تناقص احتمالات النجاح عاما بعد آخر . لقد أتفق على الحاجة بوجه عام الى ٢٠-٤٠ ألـف مركب جديد تخلق للحصول على مركب واحد يصل حتى المستوى التجارى . هذه التكاليف والضغوط الاحصائية تعنى أن صناعة الكيميائيات الزراعية يجب ان تستخدم كل الوســـائل المتاحة لكى تجعل من عملية الاكتشاف ذات كفاءة عالية بقدر الإمكان .

يعتمد الكشف عن مركب كيميائى للأغراض الزراعية على أربعة مصادر رئيســـية للمركبات الجديدة وهى : كيمياء تخليقية جديدة ، كيمياء المرادفات والمشتقات ، المنتجـــات الطبيعية ، التصميم البيوكيميائى . إيجاد الاقتراب الأول يتضمن فقط النواحـــى الكيميائيـــة للتخليق المقترح . بمجرد عمل مركبات قليلة وإجراء اختبارات التفرقة والتفضيل فيما بينـــها تجرى عمليات النخليق اللاحق على المركبات التى أعطت مؤشرات عن تأثيرات بيولوجيـــة مبشرة . فى الاتجاه العكسى يبدأ الاقتراب الثانى والثالث من مركب معروف عنه بل مؤكـــد عنه إحداثه للتأثيرات البيولوجية المطلوبة . الاقتراب الرابع متميز حيـــث يـــتركز العمـــل الأولى على اكتشاف مثبطات بيوكيميائية مع النواحى البيوكيميائية محل الاعتبـــار . تتـــابع خطوات عملية الكشف الشامل موضحة فى الشكل (٣-١) . مع أى مشـــروع فـــى مجـــال الحصول على مركب فعال بيولوجيا لابد أن يكون واضحاً من البداية المركب البادىء مـــع

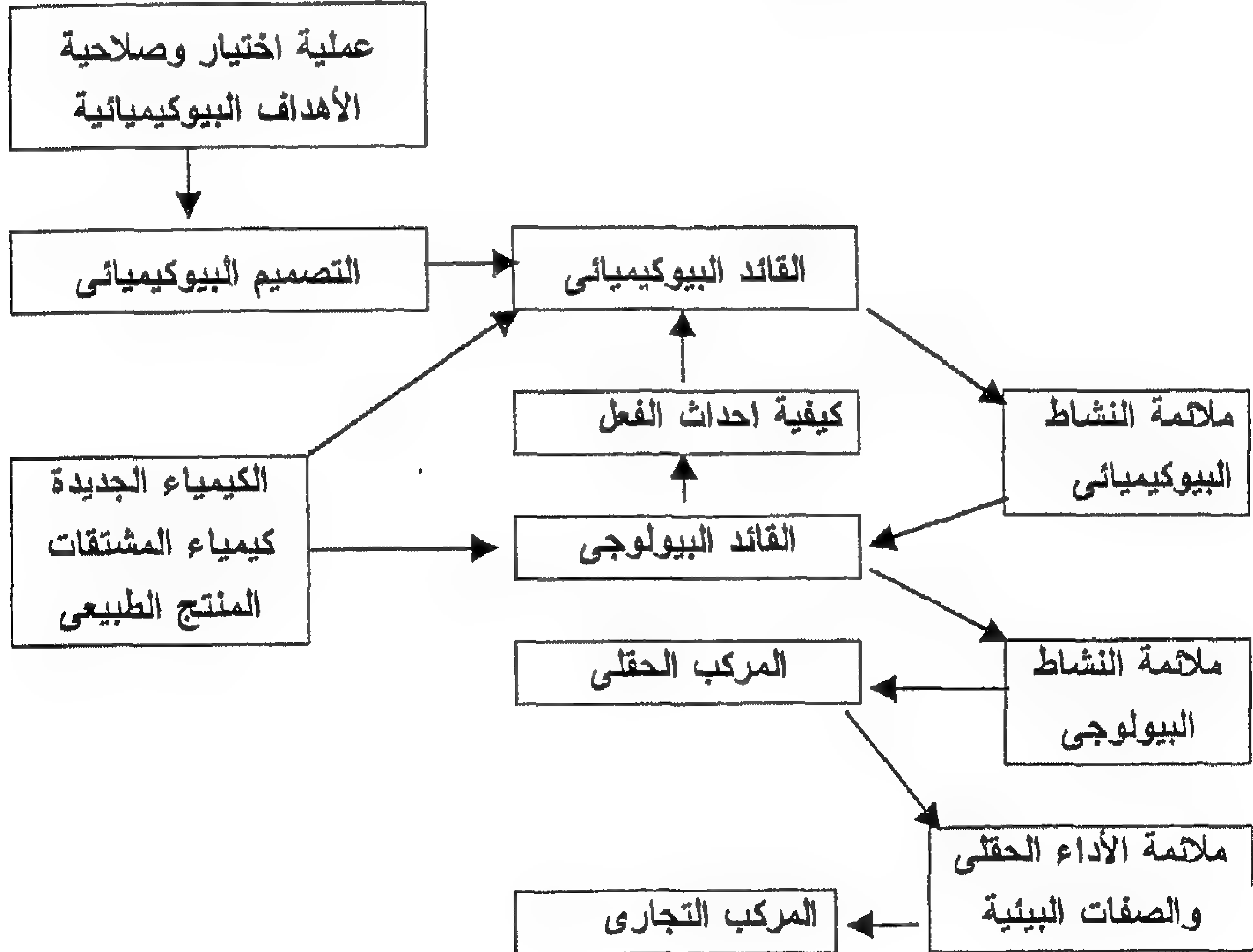
الأخذ فى الاعتبار وجود عوامل أخرى متعددة تشترك فى العملية بالرغم من نقطة البداية . سنحاول فى هذا المقام القاء الضوء عن التقدم فى البيولوجيا الجزيئية والكيمياء الحيوية وتكنولوجيا الحسابات الآلية وكيفية الاستفادة منها فى الكشف عن مركبات زراعية فعالة بيولوجيا . سوف يتم التناول من ثلاث زوايا :

١-انتخاب وتقييم وصلاحية الأهداف البيوكيميائية الجديدة .

٢-التصميم البيوكيميائى لمثبطات جديدة .

٣-ملائمة المركبات القيادية أو البادئة .

ليكن معلوما أن تحقيق أية نجاحات ستكون مرهونة بمدى التنسيق والتكامل بين هذه الاقترابات جميعا وربطها بالتخليق الكيميائى والتقييم الحيوى خلال مشروع الحصول على المركب الجديد ذات الفاعلية البيولوجية .



شكل (٣-١) : استعراض تخطيطى لعملية الكشف عن مركب جديد فى مجال الزراعة

إختيار وتقييم الهداف البيوكيميائية الجديدة : Selection and Evaluation

عملية التصميم أو التخطيط البيوكيميائى تبدأ باختيار العملية البيوكيميائية المناسبة . إن مواضع فعل المبيدات المعروفة والمؤكدة والمتفق عليها تعتبر نقطة بداية هامة وقيمة (من يريد الرجوع للحصر المرجعى عن مواقع فعل المبيدات الإطلاع على اصدارات Corbett وآخرون (١٩٨٤) ، Kirkwood (١٩٩١) ، Koller ، ١٩٩٢) . بالطبع تتزايد فرص الحصول على مركبات جديدة تماما إذا كانت تعمل على مواقع جديدة لإحداث الفعل . التحدى الحقيقى يتمثل فى اختيار الانزيم المناسب أو المستقبل المناسب من بين الآلاف الموجودة فى كل كائن حى ومن ثم نقول أنه ليست كل العمليات البيوكيمائية تعتبر أهداف مناسبة للكيميائيات الزراعية . حتى وقت قريب كان يعتمد اختيار الأهداف البيوكيميائية الجديدة للعمل عليها على فرضية وحدس رجل الكيمياء الحيوية . بالنسبة للأهداف التى تختار عن هذا الطريق تظل محاطة دائما بالشكوك حول ضرورياتها وجدواها كبادئات لعملية الحصول على المركب الجديد وكمثال ما يحاط بها من شكوك حول إمكانية وجود طرق بديلة عن هذه الأهداف والمواقع . عدم اليقين هذا قد يحد ويقلل من الثقة والمصداقية المطلوبة فى تصميم مشروع عن المثبطات المعقدة للأهداف المقترحة . من الأمثلة الجيدة عن كيف أن هذه النظرية نتسم بالخطأ ما تتعلق بانزيم Ketol – acid reductoisomerase الذى يشترك فى التخليق الحيوى للأحماض الأمينية ذات السلاسل المتفرعة . كما سيأتى ذكره بالتفصيل فيما بعد عن أن هذا الانزيم يعتبر هدف جيد ذات مصداقية كبيرة إلا أنه لم يثبت ذلك عند التطبيق العملي . من حسن الطالع أنه أصبح فى الإمكان فى الوقت الراهن التقدير التجريبى الميدانى للحكم على ما إذا كان انزيم ما يصلح كهدف جيد للمركب الكيميائى قبل بدأ برنامج التخليق على الأقل فى نطاق مبيدات الحشائش والمبيدات الفطرية . من أهم الاقترابان الممكن استخدامهما دراسة الطفرات القاتلة والطرق الجديدة فى الوراثة الجزيئية كما سيناقش فيما بعد . حتى الآن لم يظهر أن نفس الاقترابات قد استخدمت لاكتشاف أهداف جديدة لمبيد حشرى ما ويحدونا الأمل فى إمكانية حدوث ذلك فى المستقبل .

الطفرات القاتلة Lethal mutants

فى الوراثة التقليدية تنتج العديد من الطفرات النباتية والفطرية وهى تقدم وسائل جيدة وفعالة فى تقييم الأهداف البيوكيميائية الجديدة كمواقع جديدة لإحداث فعل المبيدات الفطرية والحشائشية . فى البحوث النباتية يعتبر من بين الأقسام الهامة من الطفرة التى تستخدم فى هذه الدراسات والأغراض الطفرة المغذية القاتلة auxotrophs والتى فيها نقص فى جانب

واحد خاص فى الآيض الخاص بالتمثيل الحيوى . مثال ذلك الطفرة القاتلة المغذية ناقصة الحمض الأمينيى والتى تموت إذا لم تزود بالحامض الأمينى المطلوب . هناك العديد من الأمثلة عن الطفرات النباتية هذه موجودة فى المراجع (Blonstein ، ١٩٨٦) وقد يتصور البعض أن سحب المادة المغذية المضافة سوف تظهر أعراض وسرعة القتل المتوقعة إذا حدث تثبيط للانزيم المفقود بواسطة مبيد الحشائش . طفرات الدخان التى تعانى من نقص الثيامين كمثال تنمو ببطىء فى ظروف عدم إضافة الثيامين وبمجرد نفاذ الثيامين فى البداية تظهر أعراض فقد الاخضرار ثم الموت . إبيضاض الأوراق النامية الجديدة تظهر بوضوح فى حالة سحب تزويد النباتات النامية بالثيامين . هذه النتائج توضح أن التخليق الحيوى للثيامين يعتبر هدف جيد لمبيد الحشائش كما كان متوقعا . لسوء الحظ فان النقطة المحددة التي يحدث عندها خلل فى التخليق الحيوى لم تحسم حتى الآن لذلك لم يعد فى الإمكان فى الوقت الراهن تعريف وتحديد انزيم معين للدراسات المستقبلية . هذه المشكلة شائعة مع العديد من الطفرات النباتية كما أنه من الصعوبة بمكان تحديد ما إذا كانت المستويات الداخلية للمادة المغذية المضافة مماثلة للمستويات الداخلية الموجودة طبيعيا . إذا كانت عالية كثيرا فان الطفرة المغذية تستطيع المعيشة والبقاء لفترة أطول بعد سحب المادة المغذية عما هو الحال مع النبات الطبيعى الذى يحدث فيه تثبيط للتخليق الحيوى بسبب مبيد الحشائش . من الصعوبة بمكان الحكم على ما إذا كان حدوث الموت سريعا سيتم بعد سحب المادة المعنية. هذا سوف يؤدى الى استبعاد العديد من الأهداف الجيدة . بالنسبة لمبيدات الحشائش ظهرت الطفرات الضوئية التنفسية التى تعانى من نقص المقدرة على التنفس الضوئى Photorespiration . تستطيع هذه الطفرات أن تعيش تحت ظروف عدم الحاجة للتنفس الضوئى (وجود تركيز عالى من ثانى أكسيد الكربون وقليل من الاكسجين) ولكنها تموت بسرعة عندما تنقل الى ظروف جوية عادية (سومرڤيل وأوجرين ، ١٩٨٢) .

فى مجال المبيدات الفطرية تأكد إمكانية وكفاءة استخدام الطفرات فى تعريف الأهداف البيوكيميائية الجديدة ولو أن ذلك مثار للتأمل والتدبر . من المعروف أن التخليق الحيوى للميلانين ذات أهمية فى المراحل الأولى من عدوى الفطر المسبب للفحة الأرز حيث أن تخليقه الحيوى يثبط بواسطة المبيد الفطرى التجارى " ترايكلازول " . حيث أن الطفرات ناقصة الميلانين لهذا الفطر P.oryzer (الطفرات البيضاء) متاحة فانه يصبح فى الإمكان استخدام هذه الطفرات لتقريز صلاحية التخليق الحيوى للميلانين كهدف جديد للمبيد الفطرى . هذا مطلوب لعمل اختبار للمرضية حيث أن هذه الطفرات غير قادرة على اختراق وعدوى العائل النباتى وتستطيع أن تنمو جيدا فى الخارج بعيدا عن العائل . هذا الاختبار قد يمثل مشكلة فى بعض الأحيان حيث أن مرضية العديد من الفطريات قد تفقد من

جراء تكرار الزراعة فى البيئات خارج العائل . هذا الاختبار يفيد فى الفطريات التى تنمو خارج العائل مما يقيد من مجالات استخدامها على نطاق واسع .

استخدام الطفرات لتعريف أهداف المركبات الزراعية الجديدة تعانى من بعض المشاكل الإضافية التى تحتاج لأخذها فى الحسبان . عمل أجيال من الطفرات عملية عشوائية بالضرورة باستخدام التشعيع بالأشعة فوق البنفسجية أو المطفرات الكيميائية وليس فى الإمكان خلق طفرات لكل الانزيمات . مثال ذلك أنه فى الحالات التى يحدث فيها تعبير لأكثر من نسخة وظيفية للجين لا يكون مستحبا تحقيق طفرة لكل الجينات الوظيفية . فى هذا الاقتراب يتم دراسة الانزيمات التى يمكن التغلب على النقص من خلال تحوير ظروف النمو . بمجرد الحصول على الطفرة يجب تحليل الطرز الفينولوجى لها تحت ظروف نمو مناسبة لتحديد ما إذا كانت ذات اهتمام وأهمية فى مجال الكيميائيات الزراعية وهذه قد تكون مشاكلها الخاصة بها . حتى مع هذا الوضع يكون مطلوبا كم معتبر من الدراسات الكيميائية الحيوية لتحديد المكان الدقيق لحدوث الطفرة . فى النهاية يمثل الطفرات أن تكون الكل أو لا شيء all – or- nothing ومن ثم فان المعلومات تكتسب حول المستوى الذى عنده يحتاج النشاط لانزيم معين للخفض لكى يتحقق تأثيرات مفيدة كيميائية زراعية . فى الناحية العملية لا يستحب تحقيق تثبيط ١٠٠% فى نشاط الانزيم بواسطة أى مركب كيميائى ومن ثم تكون النتائج مع الطفرات التى تعانى كلية من نقص انزيم ما مضللة . بالرغم من هذه التحديثات فان كفاءة استخدام الطفرات القاتلة كوسائل للحكم على المسارات البيوكيميائية تحت بعض الظروف مازالت واضحة وجديرة بمزيد من الاهتمام .

الوراثة الجزيئية Molecular genetics

الاقتراب النموذجي لتعريف وتقييم الأهداف الجديدة يتمثل فى إحداث تغيير متخصص فى مستويات الانزيم الذى تم اختياره والتقدم الحديث فى البيولوجيا الجزيئية فى الوقت الراهن فتح آفاقا مبشرة فى هذا الاتجاه . هناك طريقين لتحقيق هذا الهدف الأول فيما يعرف " تعطيل الحمض النووى رنا antisense RNA " وهى الطريقة التى تختار مع النباتات والثانى إحداث الخلل فى الجينات وهى طريق الاختيار فى الفطريات . حيث أن كلا الطريقتان تتطلب توفر جين للانزيم المستهدف فانه تجدر الإشارة الى استعراض الاقترابات الممكنة للحصول على هذا الجين قبل تناول الطريقتان .

كلونة الجين Gene cloning : بالرغم من تحقيق كلونة للعديد من الجينات ومع تزايد أعدادها بشكل مضطرد فانه فى عدد محدود من الحالات مع جين معين ذات الاهتمام سيكون متاحا للكائن المستهدف . تجدر الإشارة الى أنه مع طريقة التعطيل والخلل الجينى

كلاهما يستلزمان بالضرورة أن يكون الجين من الكائن تحت الدراسة متوفرا . لذلك فان العديد من المشروعات سوف تبدأ بكلونة الجين محل الاهتمام وهناك أربعة طرق أساسية يمكن أن تستخدم وسوف نقوم باستعراض بعض الأمثلة لها :

١-المجسات غير المماثلة .
٢-تفاعل سلسلة البوليميريز .
٣-التكامل الوظيفى .
٤-تنقية البروتين .

الطريقتان الأوليتان تعتمد على تتابع الجين للبروتين محل الاهتمام والذى يكون متاح من الكائنات الأخرى . إذا كانت ليست هذه الحالة فان الطريقتان الاخيرتان يكونا مطلوبتان. سوف نركز فى هذا المقام على موضع استخدام الطريقة لكلونة الجين محل الاهتمام بالنسبة لصناعة الكيميائيات الزراعية .

المجسات غير المتماثلة Heterologous probing : يستخدم هذا التكنيك الجين الذى سبق كلونته من أحد الكائنات كمجس للجين المقابل فى الكائن المستهدف . الجين الهدف لمبيد الحشائش وهو انزيم أسيتولاكتات سينسيز كمثال كلونته من الدخان A.thaliana باستخدام ساكاروميسيز سيرفيسيا جين IL V2 المعروف تشفيره للانزيم (Mazur وآخرون ، ١٩٨٧) .

تفاعل سلسلة البوليميريز PCR : فى السنوات الخمس الأخيرة تم إدخال هذه الطريقة الفعالة للعاملين فى مجال البيولوجيا الجزيئية . لقد تمت كلونة العديد من الجينات بواسطة تفاعل PCR بما فيها انزيم كيتين سينسيريز وهو المواد الفعالة كمبيدات فطرية البولى أوكسينات والنيكومايسينات (بوين وآخرون ، ١٩٩٢) . تتابع الحمض الأمينى للكيتين سينسيريز من الكائنات S.cerevisiac وكنديدا البيكانز تمت مقارنتها وأوضحت مناطق محفوظة بشكل عالى . النيوكليتدات المحدودة التى تمثل هذه التتابعات تم تخليقها واستخدامها فى تكبير جزء من جين انزيم تخليق الكيتين من خمسة عشر فطرا . من الواضح أن هذه البادئات للتفاعل PCR تستخدم بكفاءة لكلونة انزيم الكيتتين سنيسيز .

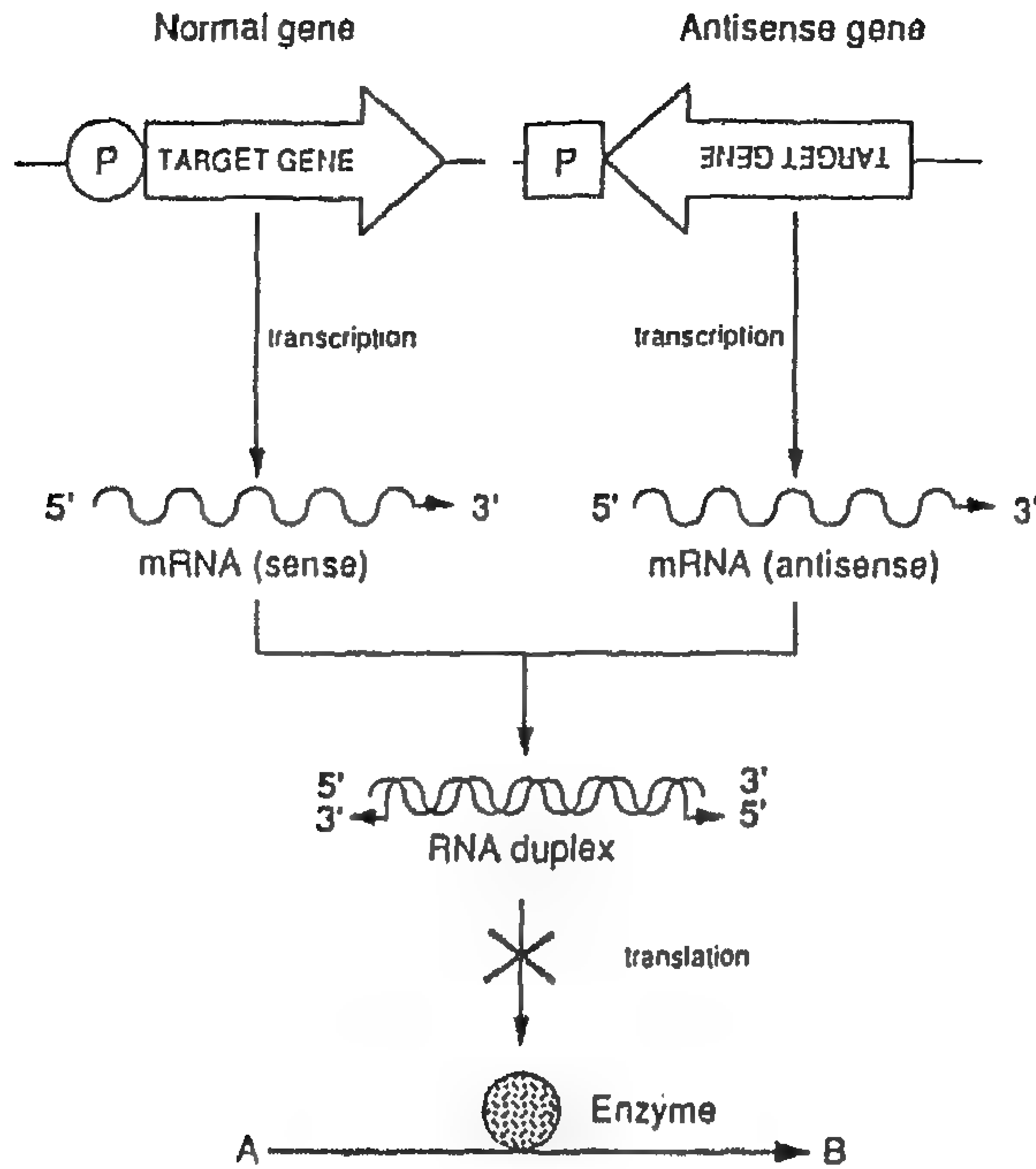
التكامل الوظيفى : فى هذه الطريقة يتم نقل مكتبة الجين من الكائن محل الاهتمام فى طفرة مناسبة (عادة أوكسوتروفيك) والتى تعانى من نقص وظيفة هدف الجين الداخلية . حيث أن الطفرة تستفيد اكتساب القدرة على النمو على الحد الأدنى من البيئة (لاتدوم طويلا كأوكسوتروفيك) فأنها تكتسب الشفرة الجينية للانزيم محل الاهتمام . من الأمثلة الجيدة فى هذا الخصوص ما قام به Minet وآخرون (١٩٩٢) وفيه بعض الجينات محل الاهتمام

كأهداف لمبيد الحشائش من A.thaliana تم تعريفها من خلال التكامل الوظيفي لثمانية طرز مختلفة من الأوكسوتروفس S.cerevisiae .

تنقية البروتين : تنقية الانزيم محل الاهتمام بما يحقق التجانس تسمح بإمكانية تقدير جزء من تتابع البروتين . باستخدام هذه المعلومة يمكن تصميم مجسات النيوكليتيدات المحدودة لكلونة الجين محل الاهتمام . مثال ذلك ما أمكن كلونة الهستيدينول ديهيدروجينيز في الكرنب وهو الهدف الخاص بمبيد الحشائش باستخدام هذه الطريقة بواسطة Nagai وآخرون ، ١٩٩١ .

الرنا المعطل Antisense RNA : أساس الطريقة موضح فى الشكل (٣-٢) وقد تم استعراضه مرجعيا بواسطة MoL وآخرون ، (١٩٩٠) . يتم عزل الجين الخاص بالانزيم ثم يعاد إدخاله فى الكائن فى توجيه عكسي . استخدام هذا الاقتراب يتضمن بادىء مناسب ومن ثم يقوم الجين الجديد بإنتاج الحمض رنا المعطل antisense mRNA (من الخلف للأمام back – to – front) . هذا أدى الى الاعتقاد بأن أبعاد الحمض الرنا الطبيعى من خلال الارتباط به بالرغم من أن التقنيات الفعلية المشتركة فى العملية لم تحسم بشكل كامل. النتيجة النهائية تتمثل فى خفض مستويات الحمض mRNA الطبيعي ومن ثم خفض مستويات البروتين . من أفضل الأمثلة المعروفة عن تكنولوجيا التعطيل ولو أنها لا تتعلق بمبيدات الحشائش ما تتمثل فى خفض التعبير للبولى جالاكتو يورونيز خلال نضج الطماطم . يسبب هذا الانزيم فى العادة تطرية الثمرة ولقد طورت شركتى ICI وكالجين نباتات تحتوى على جين معطل للبولى جالاكتو يورونيز . هذه النباتات تنتج ثمار ذات محتوى قليل جدا من نشاط أو خالية من البولى جالاكتويورونيز ويحدث تطرية بطيئة للثمار على الرف (سميث وآخرون ، ١٩٨٨) . هناك زيادة سريعة فى استخدام تكنولوجيا "الرنا المعطل" فى تنظيم مستويات مدى واسع من الانزيمات . التعاون فى هذا المجال أدى الى خلق نباتات تحتوى على جين معطل لانزيم اسيتولاكتات سينسيز وهو هدف مبيد الحشائش (حيث يشترك فى التخليق الحيوى للأحماض الأمينية ذات السلاسل المتفرعة) . النباتات معطلة الجين الناتجة تحرر فى البداية بإضافة الأحماض الأمينية متفرعة السلاسل ولكن وبمجرد نقلها الى الأرض الطبيعية فان النباتات سرعان ما تظهر أعراض تماثل تلك المرتبطة بمبيدات الحشائش التى تثبط هذا الانزيم وما يستتبعه من موت (فوستر وهوفجين ، ١٩٩٣) تجرى الدراسات على قدم وساق فى معظم أنحاء العالم للحصول على هذه النباتات المعطلة للجين ومحاولة إيجاد انزيمات خاصة تعتبر كأهداف لإحداث فعل المبيدات الحشائشية . مع هذا فقد أمكن تحقيق تأثيرات درامية عل البناء الضوئى والنمو النباتى من خلال خفض الانزيم المحدد فى عملية البناء الضوئى ريبولوزباى فوسفات كربوكسيليز لأقل

من ٥٠% (كويك وآخرون ، ١٩٩١) . ربما لا يكون هذا الانزيم هدف لمبيد الحشائش بسبب المستويات متناهية العدد التى توجد فى النباتات . المراجع مليئة بالأمثلة التى توجه الباحث نحو اختيار الانزيمات والأهداف الصحيحة لمبيدات الحشائش وعدم الجرى وراء ما ثبت عدم تأثيره . مثال ذلك أنه كان يعتقد أن التخلص الكامل من انزيم سيتوسوليك بيروفات كينيز (والذى كان يعتقد أنه الانزيم المفتاح فى عملية التحلل الجليكولى) لن يؤثر عكسيا على النمو مما يوضح أن النباتات على غير المتوقع لها مسارات بديلة متاحة . لقد لوحظ نفس الشىء مع انزيم فينيل الانين أمونيا لييز والذى يلعب دورا فى اللجننة وكان يعتبر من الأهداف الهامة لمبيدات الحشائش . لقد تأكد العكس بواسطة الكيند وآخرون ، (١٩٩٠) حيث أوضحوا أنه على الرغم من النباتات المعدلة وراثيا للدخان والتى بها مستويات قليلة من هذا الانزيم بل ظهرت اعراض مرئية دون موت . يحدونا الأمل فى المستقبل باستغلال بادئات تحفيزية مع الجين المعطل ومن أمثلة هذه المحفزات البادىء المحفز بالتتراسيكلين (جاتز وآخرون ، ١٩٩٢) . هذا النظام سوف يفتح الطريق أما إدخال جزىء صغير للنبات القائم لتحفيز التعبير عن جين معطل ومن ثم خفض مستويات الانزيم الهدف فى أى وقت . بالطبع فان اقتراب التعطيل الجيني ذات محدودية فى الحالات التى يتم فيها التعبير بنسخ متعددة مختلفة عن جين واحد حيث يكون تعطيل " الرنا " مطلوب لكل جين على حده . يجب أن يكون الانزيم ثابتا بشكل خاص فى الداخل وينهار ويعاد تخليقه فقط بمعدلات منخفضة جدا ثم أن الخفض فى mRNA قد لا يخفض حقيقة مستويات النشاط الانزيمى على امتداد فترة معقولة من الزمن . هذا يمثل محدودية خاصة فى حالة استخدام بادئات تحفيزية . بدون شك يجب بل مطلوب اجراء تحليل بيوكيميائى دقيق للنباتات التى تنتج عن هذا الاقتراب حتى يمكن وضع الاستنتاجات الواقعية والعقلانية. فى النهاية يجب أن يترسخ فى الأذهان أن هذا الاقتراب مازال فى بداية أو مرحلة المراهقة العلمية لأنه يتطلب استثمارات ضخمة للوقت والجهد على كل انزيم محل الدراسة .

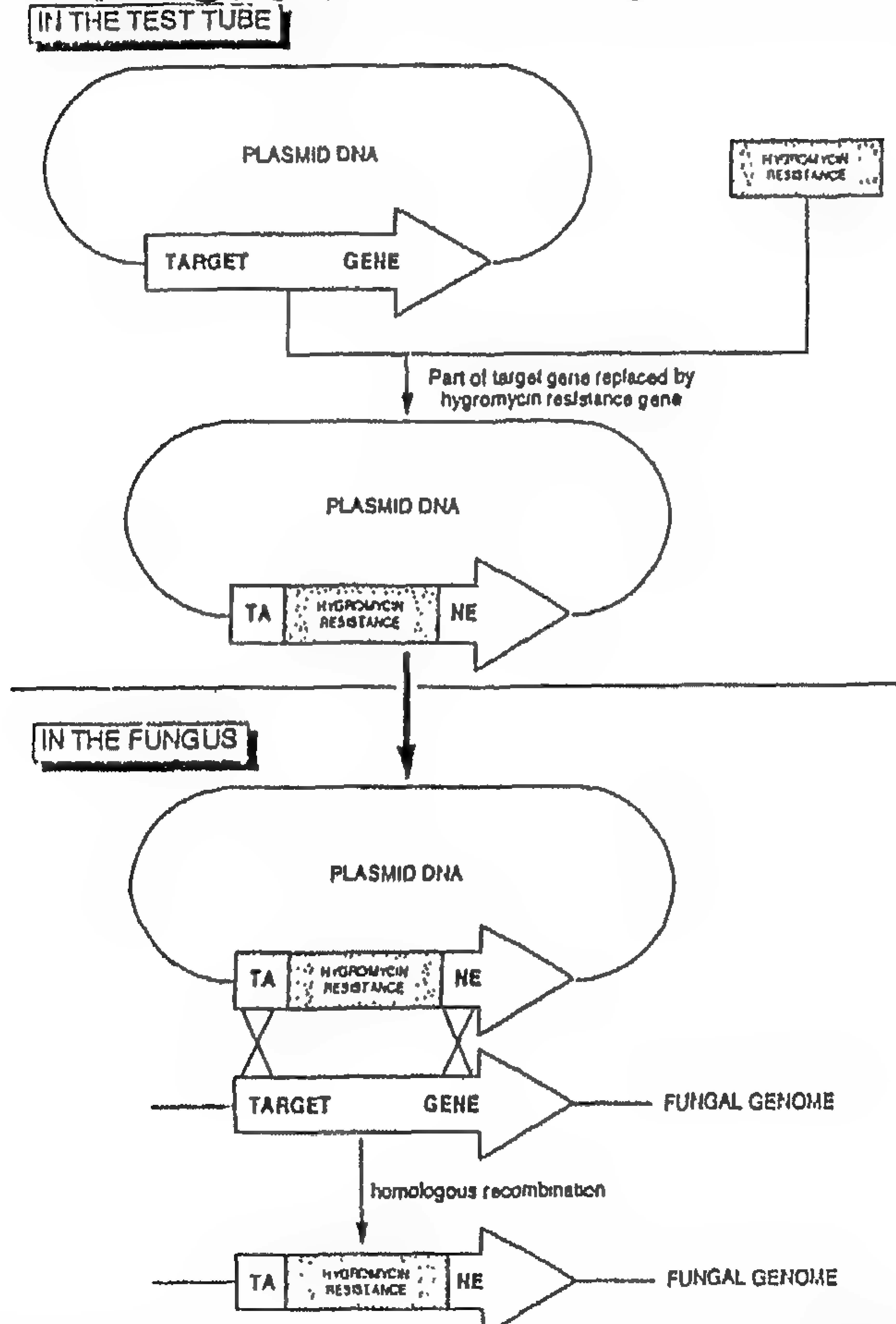


شكل (٣-٢) : صلاحية الجينات المستهدفة للتعطيل فى النباتات . فى النبات البادىء (أ) يقـود التعبيـر الخاص بالجين المستهدف لإنتاج mRNA (النسخ) . الحمض mRNA عـادة يسـتخدم كصفيحة تخليق البروتين بالريبوسوم لإنتاج الانزيـم المسـتهدف (ترجمـة) . الانزيـم المستهدف يساعد فى تحويل A الى B . لخلق نبات معطل الجين يتم إدخال نسخة مـن الجين المستهدف فى الاتجاه العكسى مع اعتبار دور البـادىء (أ) وفـى العـادة يشـتق فيروس موزايك القرنبيط . هذا البادىء يقود تعبير جين معطل ليعطى mRNA معطـل. يعتقد أن mRNA الحس والمعطل يكونا مزدوج مما يعـوق ويمنـع ترجمـة mRNA الخاص بالحس .

الخلل الجينى Gene disruption

هذا الاقتراب مازال محدودا حتى الآن مع الفطريات . لقد طور فـى البدايـة مـع سالاروميسيس سيرفيسيا وبعض الفطريات الخيطية غير الممرضة والآن امتدت مظلة هـذا الأسلوب لتشمل الفطريات النباتية الممرضة كما هو واضح فى الشكل (٣-٣) . فى الخطوة الأولى يتم عزل الجين محل الاهتمام ثم يحدث له التشويش أو الخلل (فى أنبوبة الاختبار) باحلال شريحة منه بجين آخر عادة ما يكون الجين المسئول عـن المقاومـة للمضـادات الحيوية . هذا البناء يعاد إدخاله الى الفطر حيث الدمج المتجانس سوف يبادل الجين الطبيعى

بالجين المشوش . هذا التبادل يؤدى الى فقدان الفطر للنسخة الوظيفية للجيـــن المســـتهدف واكتساب جين مشوش مستهدف (ومن ثم مقاومة للمضاد الحيـــوى) . هـــذه الفطريـــات المتحولة يمكن عزلها بتنميتها فى وجود المضاد الحيوى . فى الحقيقة فان هـــذا الاحـــلال الجينى لا يحدث بتكرارية عالية جدا كما فى الجين المشوش والذى يستطيع التكامل عشوائيا فى الجينوم . لذلك فان الباحث عليه أن يقوم بتحليل العديد من الفطريات المقاومة للمضادات الحيوية حتى يتمكن من الحصول على القليل الذى فقد الجين الوظيفي المستهدف .



شكل (٣-٣) : الخلل الجينى فى الجينات المستهدفة فى الفطريات . لكى تحدث خلل فى الجين المستهدف يجب أن يعزل ثم يجرى احلال لجزء منه مع جين معلم مثل الجين المقاوم للهيجرومايسـين فى بلازميد ناقل قادر على تحويل الفطر . هذا البناء يعاد إدخاله فى الفطر حيـث يحـدث إحلال الجين البرى بالمندمج المتجانس بهدف حدوث الخلل . النسخ والترجمة سوف تنتـج انزيم يقاوم الهيجرومايسين فقط ومن ثم تفقد وظيفة الجين المتحول.

هناك ثلاثة أمثلة فى المراجع للخلل أو التشويش الجينى فـــى الفطريـــات النباتيـــة الممرضة . اثنان لانزيم كيوتينز ذات الأهمية الكبرى فى اختراق الفطر للسطوح النباتيـــة. لقد قام الباحثان ستال وشيفر ، (١٩٩٢) بإحداث خلل وتشويش فى جين الكيوتنـــيز لفطـــر نيكتارياهيماتوكوكا (المسبب للعفن القدمى فى البسلة) لخلق طفرة ناقصـــة الكيوتينـــيز . بالرغم من أن هذه الطفرة لا يوجد فيها نشاط للكيبوتينيز فأنها مرضية كما فى الموجودة فى الكائن البرى مما أدى الى الاقتراح بأن الكيوتينز غير هام لمرضية هذا الفطر . هناك مثـــال آخر حيث قام سويجارد وآخرون ، (١٩٩٢) بإحداث خلل فى جين الكيوتيينز فـــى الطفـــر المسبب للفحة فى الأرز P.oryzae . لقد ظلت هذه الطفرات مرضية كما فى الفطر البرى. مع أن التحليلات البيوكيميائية أظهرت أنه بالرغم من أن جين الكيوتينز قد شوش فانه يوجـــد جين آخر يعظم نشاط انزيم آخر من تلك التى لم تتأثر بالتشويش . لذلك لم يتمكن البحـــاث من وضع استنتاجات عما إذا كان الكيوتينيز ضرورى لمرضية فطر اللفحة . فـــى المثـــال الثالث قام سكون جريج وآخرون ، (١٩٩٠) بإحداث خلل فى الانزيم خارج الخلية المســـمى اندوبولى جالاكتورنيز فى ممرض الذرة المعروف Cochliobolus carbonum . يتوقـــع اشتراك هذه الانزيمات فى اختراق الفطريات خلال جدر الخلايا النباتية بسبب دورها فـــى تحليل البكتين . لذلك فانه بينما أدى الخلل فى C.carbonum الى التخلص الكامل من كـــل أنشطة انزيمات الاندوبولى جالاكتورنيز فانه لم يؤثر على المرضية . لذلك يبـــدو أن هـــذه الانزيمات ليست هدف مناسب للمبيد الفطرى فى هذا الفطر .

المشكلة مع هذا الاقتراب تتمثل فى أنه عندما يعبر عن نسخ عديدة من نفس الجيـــن فأنها جميعا يجب أن تشوش . لذلك فانه وكمثال مع انزيم الكيوتينيز للفطر المسبب للفحـــة الأرز فانه ولو أن مثبط الانزيم يتوقع إحداثه لتثبيط كل أو بعض صور الانزيم فانه الخلـــل الجينى يكون مطلوبا لجين جين بصفة فردية . هناك مشكلة أخرى أنه من المفيد العمل مـــع الانزيمات حيث تسمح التعديلات فى ظروف النمو للفطر بالقاء والاستمرار فى المعيشة فى غياب الانزيم المستهدف وهذا سوف يحد بالتأكيد عدد الانزيمات الواجب دراستها . خلاصة القول أن طريقة الخلل الجينى محدودة لعدد قليل من الممرضـــات النباتيـــة ذات الأهميـــة الزراعية والتى يمكن تحويلها وراثيا بواسطة " الدنا الخارجى " .

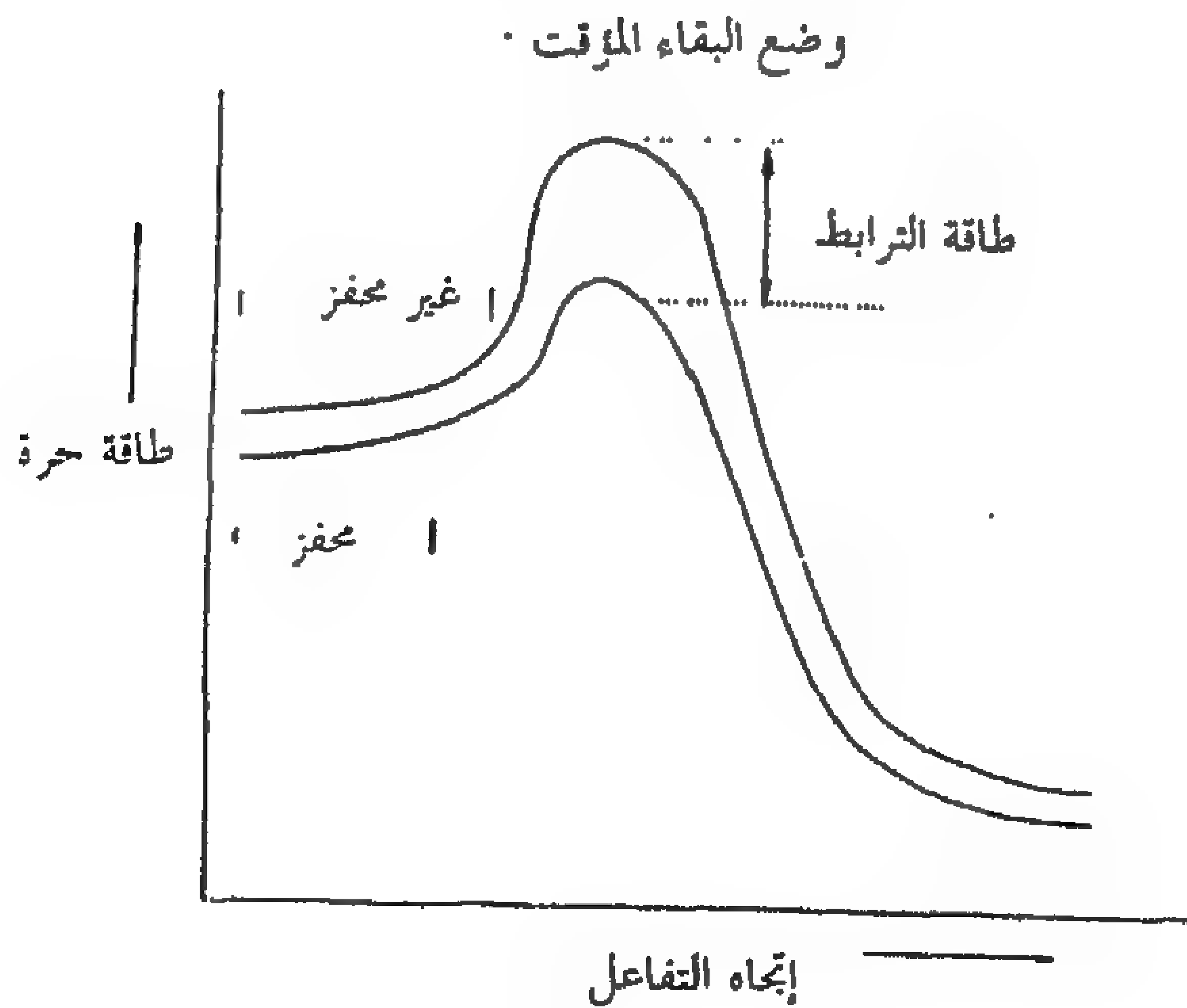
التصميم البيوكيميائى للمثبطات الجديدة Biochemical design

مفهوم التخطيط والتصميم للحصول على مركبات فعالة بيولوجيا من أولى أساسيات الكيمياء الحيوية وقد نفذت وطورت جيدا فى الصناعات الدوائية حيث أمكن تحقيـــق مـــن النجاح . بالرغم من أن هذا الاقتراب طور وحسن فى الصناعات الخاصـــة بالكيميائيـــات الزراعية ولو أنه بدرجة أقل إلا أنه لسوء الطالع حقيقة أنه لم يكتشف مركـــب بيوكيميـــائى

زراعى عن هذا الطريق . كذلك لا توجد نجاحات علمية رنانة تعطى آمال مستقبلية . فى هذا المقام سنحاول استعراض الأساسيات المشتركة فى هذه التقنية مع الإشارة الى بعض الأمثلة التى تؤكد متانة هذا الاقتراب .

أساسيات التثبيط الانزيمى Enzyme inhibition

فى إطار دور الانزيمات كعوامل مساعدة بيولوجية فأنها تسهل وتعضد تطور التفاعلات الكيميائية ومن ثم يمكن أن تثبط بعدد من الطرق والمسارات . لن نخوض فى تفاصيل التفاعلات الانزيمية وتثبيطها ومن يريد المزيد عليه أن يرجع الى Walsh،١٩٧٩. لكي يحدث تفاعل كيميائي بين مركبين فى محلول حر يحتاج المركبين أن يتقابلا فى التوجيه الصحيح وبطاقة كافية للتغلب على الحاجز عالى النشاط والمطلوب عادة حتى يحدث التفاعل . هذه الظروف تكون ملائمة لمرات غير كثيرة ومن ثم سيكون معدل التفاعل غير المساعد بطيء جدا . ماذا يفعل الانزيم على وجه التحديد يوقف حركة المركبين معا فى توجيه نموذجى للتفاعل . بالإضافة الى ذلك فان الانزيم يثبت المواد الوسيطة عالية الطاقة ومعقدات الحالة الانتقالية التى تتكون خلال منظومة التفاعل ومن ثم لانقاص الحاجز ذات الطاقة النشطة . تأثير الانزيم على نشاط الطاقة لتفاعل كيميائى ما موضح فى الشكل (٣-٤) حيث أن الاختلاف فى نشاط الطاقة بين التفاعلات المساعدة وغير المساعدة تمثل كمية الطاقة المشتركة فى ارتباط ودمج أنواع التفاعلات غير الثابتة . لذلك فان انزيمات العمليات هذه تستطيع تحقيق زيادة كبيرة فى معدل التفاعل حتى ١٠^١٤ .



شكل (٣-٤) : رسم تخطيطى يمثل الاختلافات فى نشاط الطاقة بين التفاعلات المساعدة وغير المساعدة

التداخل مع أى من هذه العمليات سوف يمنع الانزيم من تأدية تفاعله العــــادى . أى مثبط سوف يرتبط ببساطة بالانزيم بتكوين عدد من التداخلات مع الأحماض الأمينية والتــى تجعل الانزيم فى طريقة يمنع حدوث التفاعل الكيميائى العادى . تعتمد كفاءة المثبط على قوة التداخلات المتكونة وهذه قد تكون متكافئة أو غير متكافئة . يجرى تقسيم نوعى للمثبطـــات غير المتكافئة فى المراجع الى نوعين رئيسين وهما التنافسية وغير التنافســية . المثبطـــات التنافسية النقية تتداخل مع الانزيم عند موضع الارتباط فى الوسيط العادى ومن ثم تحـــدث خفض واضح فى قابلية الانزيم للوسيط وهو التأثير الممكن التغلب عليه من خـــلال زيـــادة تركيز الوسيط . المثبطات غير التنافسية تتداخل عند موقع مميز عن موقع ارتباط الوســـيط ومن ثم يقلل معدل التفاعل الشامل وليس قابلية الانزيم للوسيط . الأمثلة عن معظم الأنـــواع التقليدية للمثبطات يمكن أن توجد بين الكيميائيات الزراعية التجارية وسوف تعطى بعـــض الأمثلة فيما بعد . بالرغم من أن القليل من الكيميائيات الزراعية ترتبط تكافؤيا مع الانزيمات المستهدفة لها فان المبيدات الحشرية الكارباماتية والفوسفاتية والتى تعمل من خـــلال تثبيـــط انزيم الأستيايل كولين استريز (الانزيم المحدد المفتاح فى النقل العصبى) كلها أمثلة لـــهذا النوع من التداخل .

المثبطات التنافسية النقية تمثل بالبولى أوكسينات النشطة ضد الفطريات والتى تثبـــط انزيم الكيتين سينسيز (الذى يشترك فى التخليق الحيوى لجدار الخلية) من خلال محاكــــاة الوسيط العادى للانزيم UDP N-acetyl glucosamine . لكى نحقق عدم تنافس للوســيط العادى يكون مطلوبا تداخلات إضافية للمثبط مع الانزيم بعيدا بشـــكل جزئــي عـــن تلـــك المشتركة فى الارتباط مع الوسيط . مثال ذلك مع مركب البروكلوراز والذى يمثل أحد أفراد مجموعة كبيرة من المبيدات الفطرية . التى تثبط خطوة المثلله فى التخليق (14α-) الحيوى للارجيستيرول من خلال التداخل مع الانزيم مع كلا الارتباط مع وسيط الاستيرول العـــادى أو مع الحديد الموجود أيضا فى وعند الموقع النشط . يمكن تحقيق ارتباط قوى وفعال مـــع الانزيم من خلال محاكاة معقد الحالة الانتقالية أو الوسيط ذات الطاقة العالية جدا والمرتبطـــة بشكل قوى جدا بالانزيم خلال التفاعل الكيميائى العادى . هذا النوع من المثبطات موصـــف جيدا مع انزيمات ريدكتوأيزوميريز والجلوتامين سينيستينز . المثبطات غير التنافسية الكاملية تمثل بمبيدات الحشائش التى تثبط انزيم Phytoene desaturase فـــى مســـار التخليـــق الحيوى للكاروتينويد (مثل نورفلوازون) .

فى النهاية يجدر ذكر مركبين كأمثلة لبعض الأنواع الأخرى من التثبيـــط الممكـــن حدوثه . مبيد الحشائش جليفوسات الذى يثبط انزيم انيـــول بـــيروفيل شـــيكيمات فوســـفات سينسيز (التخليق الحيوى للأحماض الأيضية العطرية) يعتبر مثال للتداخل المتخصص مـــع

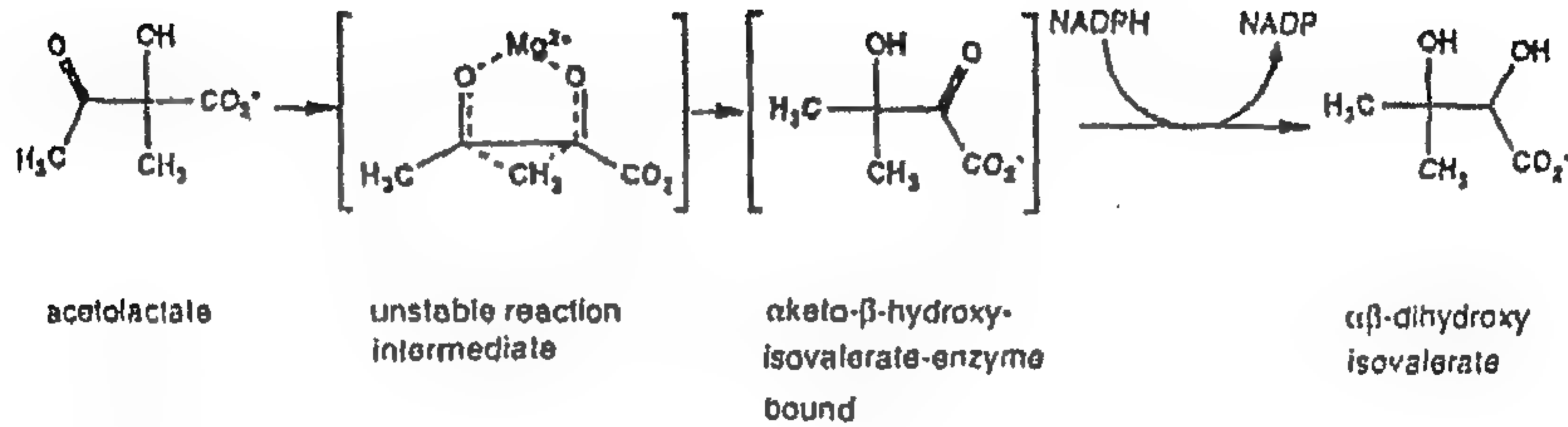
معقد الانزيم – الوسيط فقط (الذى يعرف بالتثبيط غير التنافسى) . يرتبـط الجليفوسـات بالمعقد بين الانزيم والمادة الوسيطة الأولى شيكيمات –٥– فوسفات وعندئذ يكون معقد مـن النوع الكاذب النسخ . فى النهاية تجدر ملاحظة أنه فـى حـالات خاصـة مـع مبيـدات الحشائش التى تثبط انزيم اسيتولاكتات سينسيز (التخليق الحيـوى للحمـض الأمينـى ذو السلسلة المتشعبة) . هذه المركبات (مثل كلورسلفيورون) ترتبط بالانزيم بعد أن يتداخـل جزىء الوسيط الأول بيروفات ولو أنه معروف فى الوقت الحالى أنها ترتبط عند الموقـع المتميز عن والقريب جدا مع الموقع النشط للانزيم . لقد وضع الاصطلاح مثبطات الموقـع الخارجى extrantous site inhibitors لوصـف هـذه المركبـات (Schloss and Aulabavgh ، ١٩٩٠) .

التقنيات الانزيمية كعامل لتصميم المثبط Enzyme mechanisms

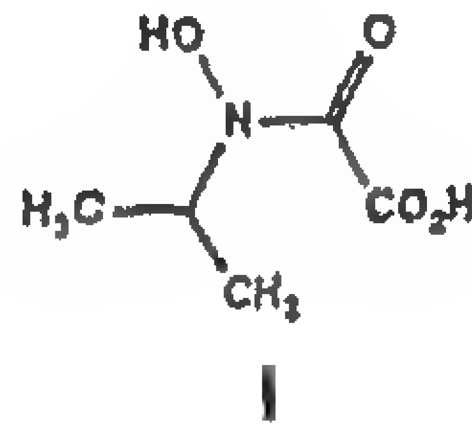
أكثر الاقترابات الجارية لتصميم الحصول على مثبط ما يحدث خلال دراسة وفـهم تقنيات الانزيم . المدخل الرئيسى يتمثل فى محاولة تصميم محاكاة أو نسخ من معقد الحالـة الانتقالية أو الوسائط الأخرى عالية الطاقة التى تتكون خلال التفاعل الكيميائى العادى . مـن المحتمل أن يكون أفضل مثال لهذا النوع من التصميـم مـا أجـرى بواسـطة Schloss ومعاونوه على انزيم كيتول آسيد ريدكتوأيزوميريز الذى يشترك فى التخليق الحيوى للحمض الأمينى متفرع السلسلة (Aulabaugh & Schloss ، ١٩٩٠) . هـذا الانزيـم يسـاعد الخطوة التى تحدث مباشرة بعد استقرار هدف مبيد لحشائش أسيتولكتات سينسيز فى مسـار التخليق الحيوى . بذلك يكون ذلك بمثابة هدف جذاب فى المسار المعروف أن تثبيطه فعـلا يحقق تأثيرات كمبيدات حشائش . عند دراسة تقنية التفاعل للانزيم (شكل ٣–٥ Dأ) فـان الأوكساليل هيدروكسامات (المركب 1 فى الشكل ٣–٥Dب) أعتبر كمشـتق متوسـط أو وسطى للتفاعل النشط . التخليق والتقييم أكدا النظرية حيث وجد أن المركب مثبط قوى مـع قابلية أو مقدرة شاملة مقدارها ٢٢ pM . من سوء الحظ فان للمركب تأثير محدود كمبيـد حشائش . قد يكون الادخال والثبات البطىء والضعيف للمركب كما توقع فـى البدايـة أن تكون السبب المسئول عن قلة النشاط البيولوجى ويعتقد الآن أن الانزيم نفسه يعتبر هـدف ضعيف لمبيد الحشائش (Wittenbach وآخرون ، ١٩٩١) . لقـد أشـار البحـاث أن استخدام المركب (I) لملامسة النباتات تؤدى الى حدوث تثبط كامل للانزيـم ممـا يشـير بوضوح أن المركب قد تستطيع الدنو والاقتراب فى الداخل . بالرغم من أن هذا المسـتوى العالى من التثبيط فان موت النباتات لا تحدث بسرعة مما يوضح أن النباتات تستطيع تحمل

نقص الأحماض الأمينية ذات السلاسل المتفرعة أو أن الانزيم يوجد بزيادة كافية للانسياب خلال المسار مما يمكن من الإصلاح .

ميكانيكية التفاعل



المثبط

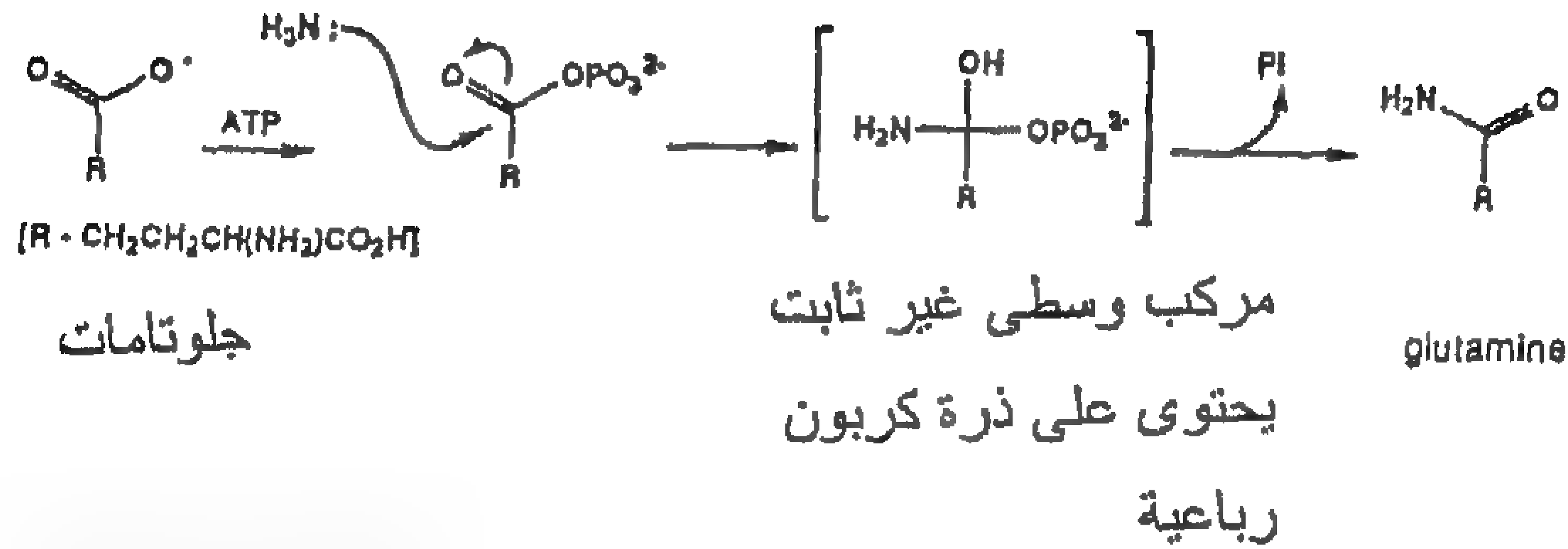


شكل (٣-٥-D) : تقنية كيتول أسيد ريدكتوأيزوميريز والمثبط (بللمور وآخرون ، ١٩٩١) .

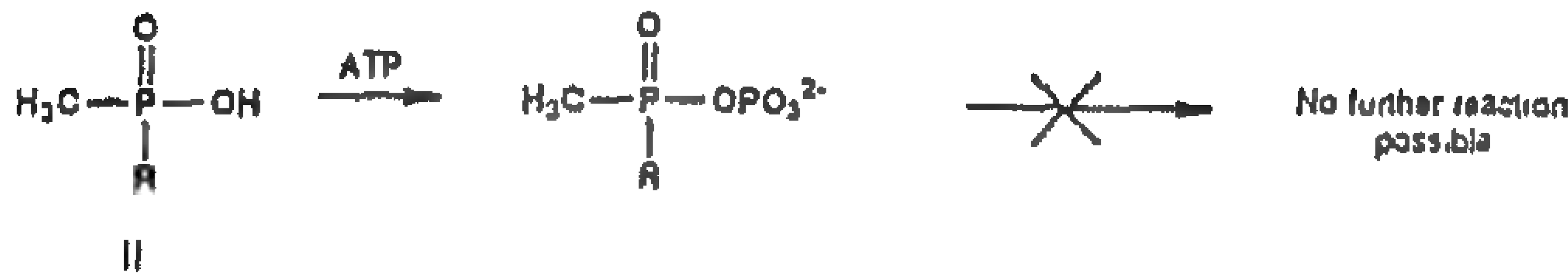
هذه النتيجة تثير العديد من الأسئلة حول الأسباب التى وراء أن تثبيط الانزيم السابق أستيولاكتات سينسيز تعطى تأثيرات قاتلة أكثر . فى الوقت الحالي لا يوجد تفسير واضح . لقد خلص البحاث الى الاقتراح بوجود عامل مساعد على حدوث الموت فى النباتات بعد تثبيط أسيتولاكتات سنسيز يتمثل فى تراكم مركب وسطى سام هو الالفا-كيتوبيوتيرات عما هو الحال مع النقص البسيط فى الأحماض الأمينية متفرعة السلسلة (La Rossa and Van Dyk ، ١٩٨٧) . هذا المثال يوضح أهمية العمل على أهداف كامنة التعريف فقط كما نوقش سابقا . هناك مثال آخر لهذا الاقتراب ورد فى العمل الذى أجرى فى المعامل على انزيم الجلوتامين سينسيتيز وهو الانزيم المحدد المفتاح فى تمثيل النتروجين غير العضوى (Wright وآخرون ، ١٩٩١) . لقد كانت نقطة البداية فى هذا العمل الأساس أن ذرة الفوسفور الرباعية تستطيع العمل كنسخة من الكربون الرباعى كجزء من التفاعلات الانزيمية التى تتضمن هجوم محب للنواة على كربون الكربونيل . انزيم الجلوتامين سينسيتز تستخدم هذا التفاعل كما فى الشكل (٣-٦) وقد افترض أن المركب (II) مثبط جيد . استعراض الدراسات المرجعية أوضحت أنه المركب (II) ثم تخليقه فى أى مكان (

Rupp وآخرون ، ١٩٧٧) وهو الآن من المركبـــات الناجحـــة تجاريـــا تحـــت الاســـم فوسفينوثريسين . هذا المثال يوضح أن التصميم البيوكيميائى للمركب الكيميائى الزراعـــى ممكن ولو أنه لم تتناوله أى مجموعة بحثية .

(a) ميكانيكية التفاعل



(b) Proposed Reaction with II

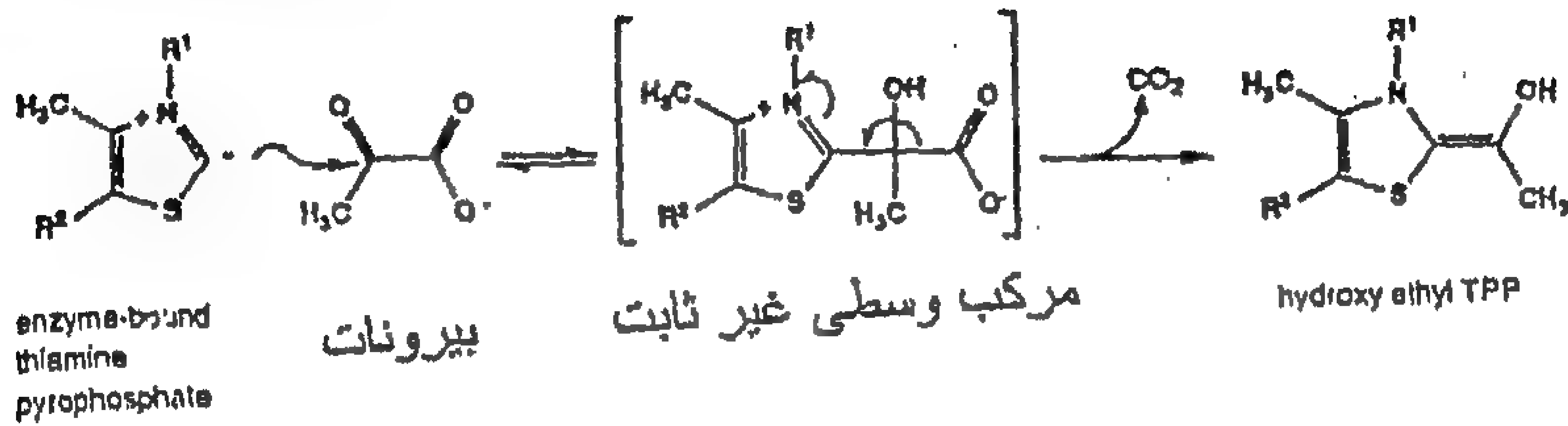


شكل (٣-٦) : تقنية الجلوتامين سينسيتيز والتثبيط (مأخوذ من Wright وآخرون ، ١٩٩١) .

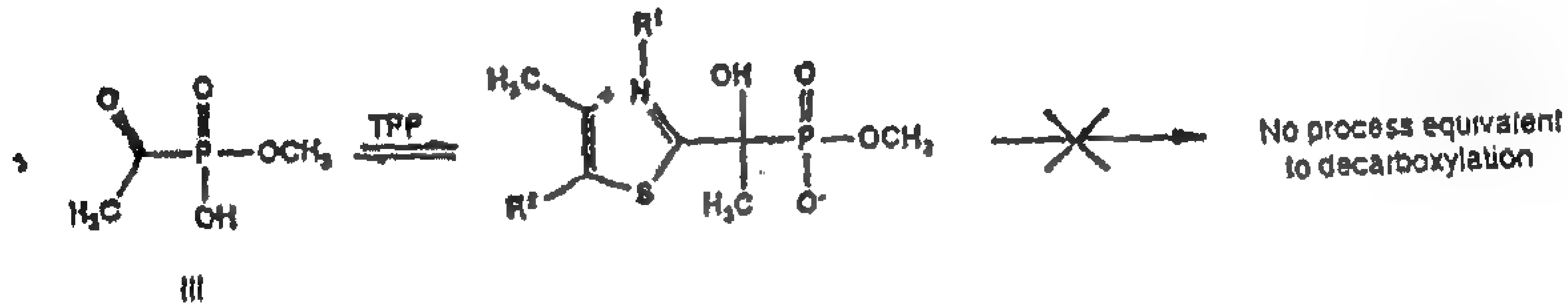
مع اختيار اى انزيم للعمل عليه فان دراسة أية مثبطات معروفة للانزيم قـــد تـــزود الباحث وسيلة لتصميم الحصول على مركبات جديدة . من الأمثلة ما أجرى فـــى المعـــامل على انزيم البيروفات ديهيدروجينيز وهو الانزيم المحورى فى تفاعلات التحلل الجليكولـــى حيث تم تعضيد هذا العمل من خلال التقرير الذى أشار الى أن المركب (III) (شـــكل٣-٧) مثبط معروف لهذا الانزيم . لقد تم إعادة تجهيز المركب III ووجد أنه يؤخر نمو النباتـــات بشكل فعال . لقد أدى ذلك الى وضع تصميم وتخليـــق مثبطـــات أكـــثر فاعليـــة (Baillie وآخرون ، ١٩٨٨) . المركب IV تم ظهوره بالتبعية كأفضل مادة للاختبارات الحقليـــة .

من سوء الطالع أن هذا المركب يسبب أضرارا بالغة للنباتات عند المعدلات التى تحقق تأثير جيد فى مكافحة الحشائش ولكن هذا المثال يوضح إمكانية تحقيق مستويات جيدة من النشاط البيولوجى من خلال هذا الاقتراب .

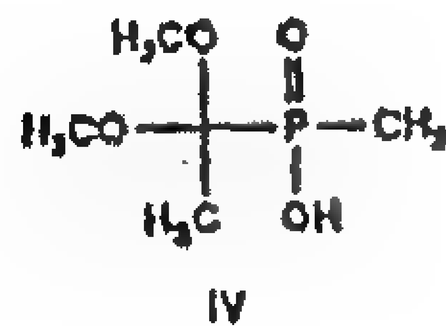
(a) ميكانيكية التفاعل



(b) Proposed Reaction with III



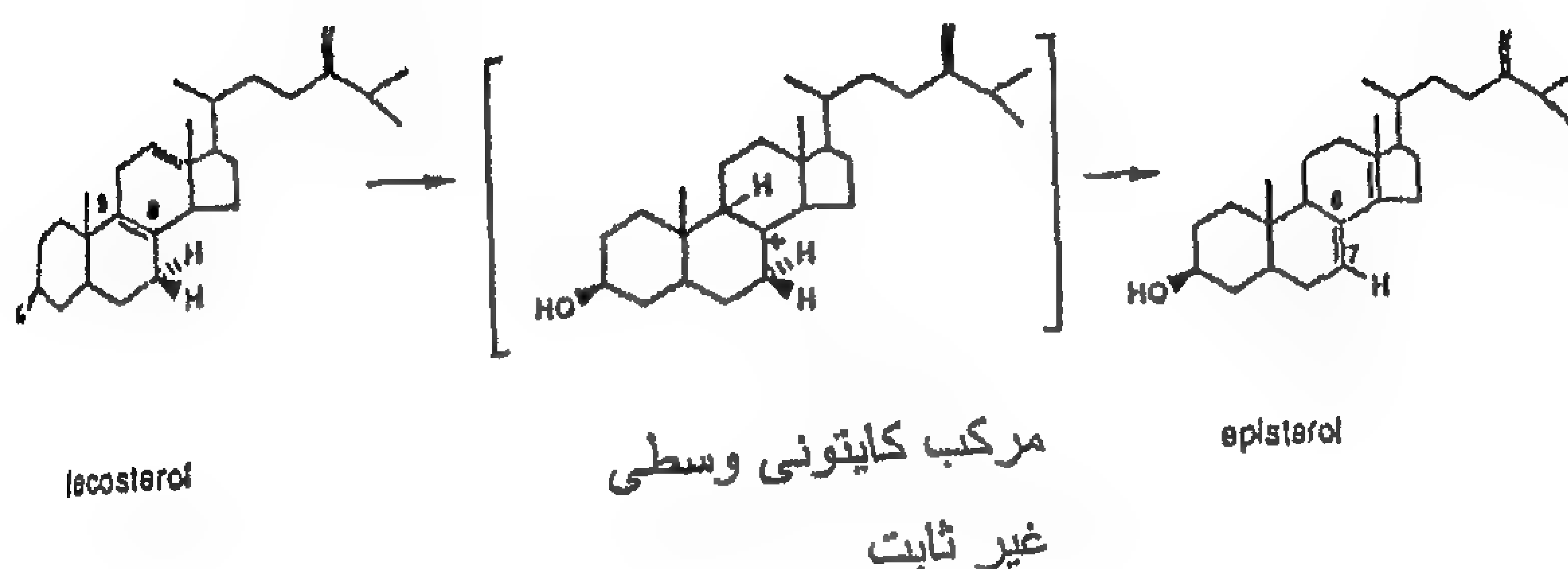
(c) مثبطات أخرى

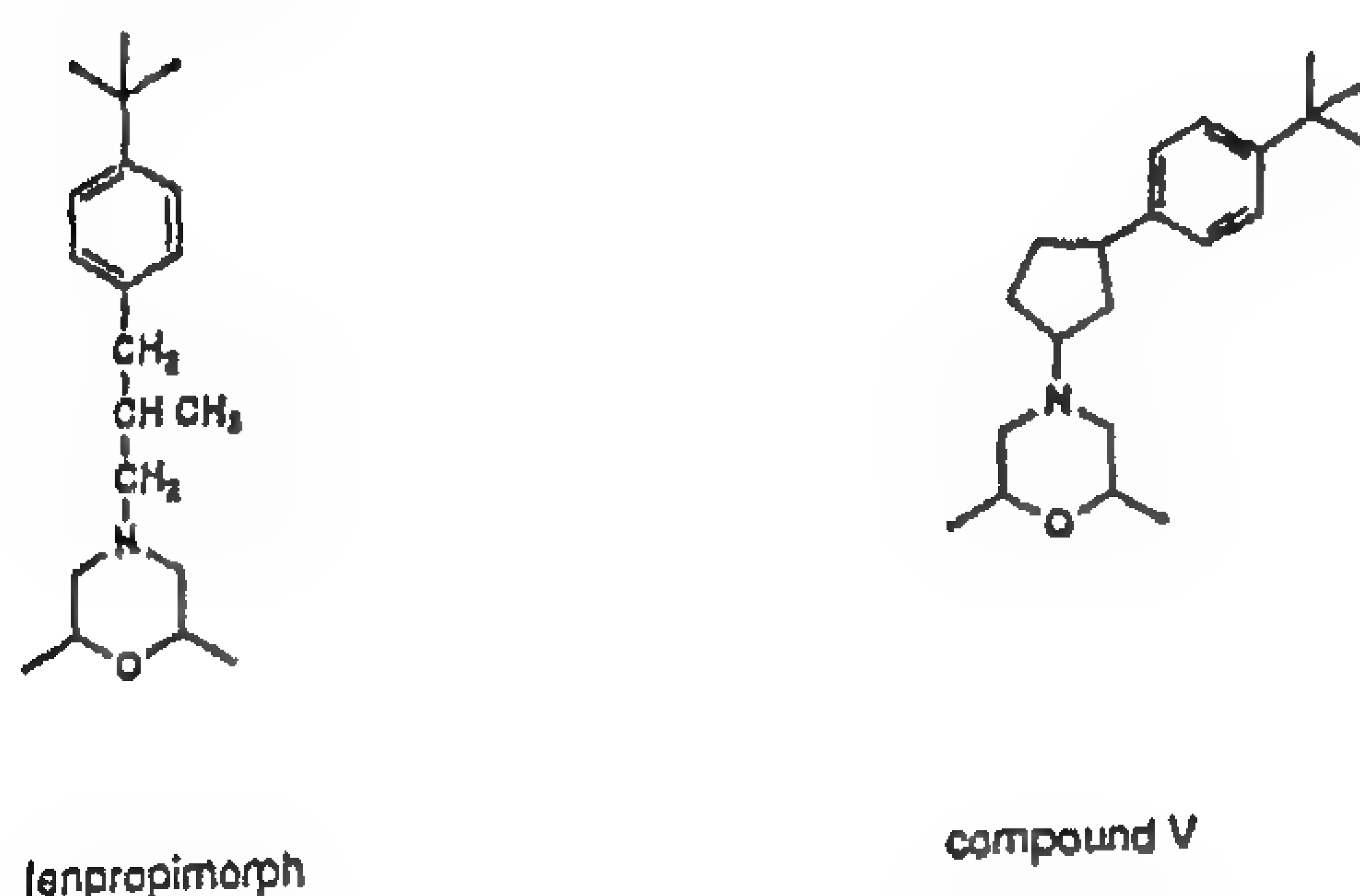


شكل (٣-٧) : تقنية البيروفات ديهيدروجينيز والتثبيط (Wright وآخرون ، ١٩٩١) .

هناك مثال آخر عن هذا الاقتراب من خلال دراسات Huxley – Tencer وآخرون (١٩٩٢) لتصميم الحصول على مبيدات فطرية جديدة قادرة على تثبيط $\Delta^{8\ 17}$ – إستيرول

إيزوميريز (التخليق الحيوى للأرجيستيرول) . عند استخدام المبيد الفطـــرى المعـــروف فينبروبيمورف كنقطة بداية مع الأخذ فى الاعتبار تقنية الانزيم خاصة الحاجة الى محـــاكى أفضل لنظام حلقة الاستيرول مما أدى الى تخليق المركب V (الشكل ٣-٨) وهو فعـــال ٢٠ مرة أكثر من الفينبروبيمورف على كلا المستويات البيوكيميائية والبيولوجية .



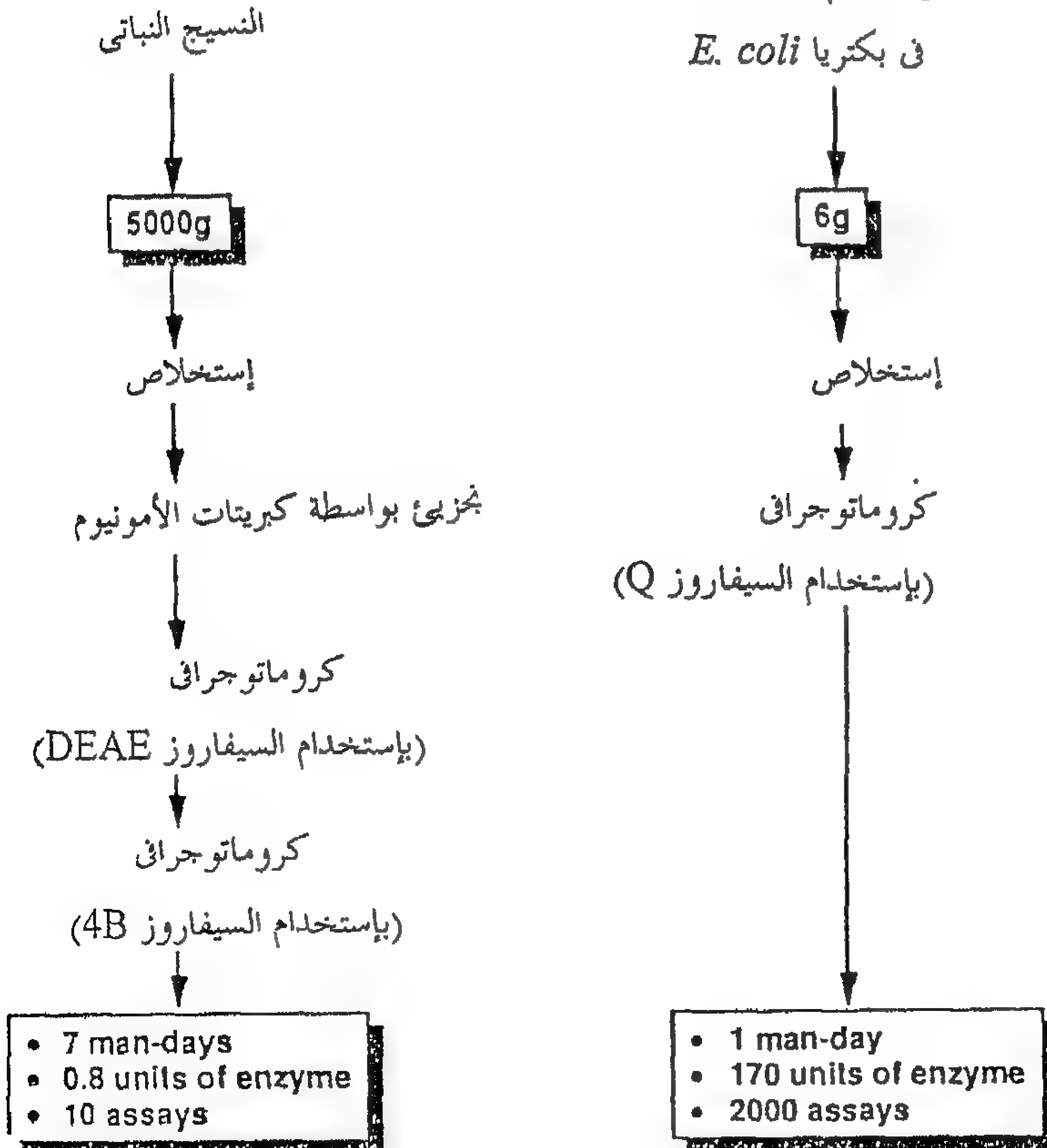


شكل (٣-٨) : تقنية Δ^{817} ستيرول إيزوميريز والمثبطات

تركيب البروتين كعامل فى تصميم الحصول على المثبط

المقدرة على إظهار الانزيمات والمستقبلات فى ثلاثة أبعاد أصبحت شـــائعة ولكـــن ببطىء وقد فتحت مدى كامل لإمكانيات جديدة لتصميم الحصول على مثبطات جديدة . فـــى الوقت الراهن تكون الوسائل الرئيسية للحصول على بيانات تركيب البروتين مـــن خـــلال البلورة والتحليل بأشعة أكس ولو أن بعض الطرق الأخرى أظهرت نتائج مبشرة . كل هـــذه الطرق تعتمد كليا على التزويد الكبير بالانزيم النقى وفى بعض الحالات يتطلب جرامات من الانزيم . هذه المستويات غالبا غير ممكن الحصول عليها بدون استخدام طرق البيولوجيـــا

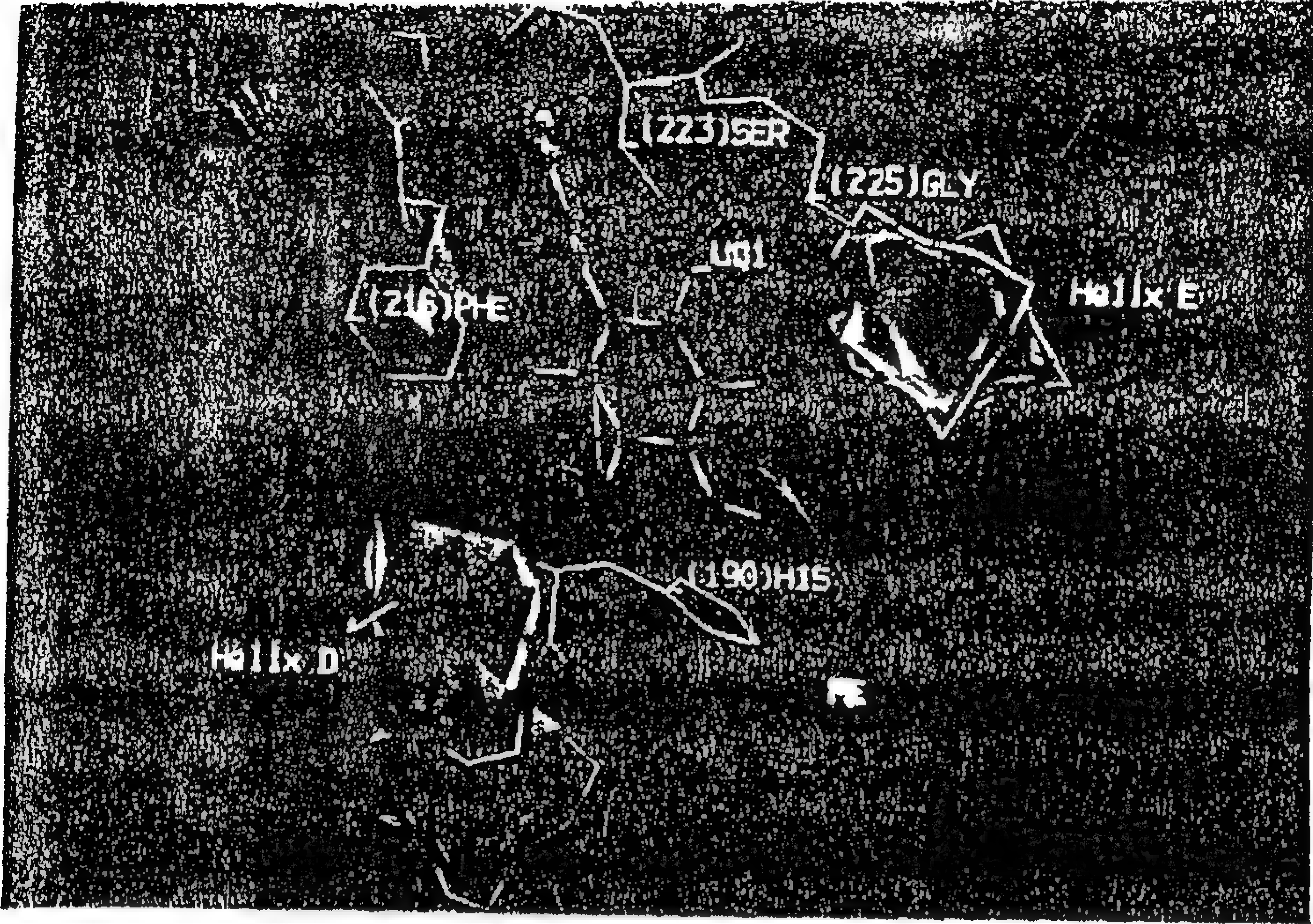
الجزيئية حتى يمكن كلونة والتعبير الفائق عن الانزيم محل الاهتمام . الآن أصبح استخدام الناقلات عالية التعبير ممكنة بشكل روتيني لتحقيق الحصول على البروتين المستهدف في بكتريا E.coli المهندسة وراثيا حتى ما يزيد عن ٢٠% من البروتين الكلى . من الأمثلة التي توضح قوة هذا الاقتراب ما أسفر عنه من نتائج في شكل إنتاج الانزيم لواحد من الأهداف المرجوة والموضحة في الشكل (٣-٩) . في الماضي كان يستغرق البيوكيميائي سبعة أيام ويستهلك خمسة كيلوجرامات من المادة النباتية لعزل ٠,٨ وحدة من النشاط الانزيمي وهي كمية كافية للاختبارات وملازمة لعشرة مركبات كيميائية جديدة . مع الانزيم المكلون فان ٦ جرام من الخلايا ويوم واحد يمكن إنتاج ١٧٠ وحدة من الانزيم وهي كافية لاختبار ٢٠٠٠ مركب جديد . من حسن الطالع أن الدراسات التى سبق الإشارة إليها للحكم على صلاحية الهدف الجديد يمكن أو تزودنا بكلون الجين ومن ثم تعطي نقطة البداية لدراسات التعبير الفائق



شكل (٣-٩) : مقارنة بين عزل الانزيم من مصدر مكلون وآخر غير مكلون

يجدر التنوية الى أن التركيب البللورى للانزيم ذات أهمية واستخدام كبير في تصميم الحصول على مثبطات جديدة إذا كانت البللورات تنتج فى روابط قوية لكى تقدم نقطة البداية للعمل . فى الوقت الراهن لم يشر إلا الى القليل جدا من التراكيب البللورية للبروتينات محل الاهتمام فى صناعة الكيمياء الزراعية ولا يوجد فى المراجع ما يشير الى تحقيق نجاحـات فى استخدام هذا الاقترات لتصميم كيميائيات زراعية جديدة . ربما تكون المجـالات التـى لاقت اهتمام كبير فى الكيمياء الزراعية هى النظام الضوئى II . هناك العديد من مجـاميع مبيدات الحشائش معروف عنها أنها تحدث فعاليتها باحلال الكينون الثـانوى مـن مكـان الارتباط Qß داخل النظام الضوئى II ومن ثم توقف وتسد نقل الالكترون بالرغم مـن أن بلورة النظام الضوئى II من النباتات لم يتحقق بعد فأن مركز التفاعل الضوئى من البكتريـا البنفسجية تمت بلورته . استخدام متناسقات النظام البكتيرى المتحصل عليـها مـن مدخـل PCR ١ فى اكتوبر ١٩٩٢ فى بنك بيانات البروتين (أبولا وآخرون ، ١٩٨٧) . أمكـن إظهار موضع upiquinone فى موضع ارتباط Qß (الشكل ٣-١٠) . قـوى اسـتخدام بيانات التبلور لتعريف التداخلات المحددة بين البروتين والروابط الصغيرة واضحـة مـن الشكل (٣-٩) والذى يشترك فيه أربعة من البقايا الرئيسية وهى , 190 (His) , (225)gly , (216) phe , Ser (223) وهى تظهر بوضوح .

فهم هذه التداخلات أدى الى منظور إمكانية تصميم مركبات جديـدة لتنظيـم هـذه التداخلات أو حتى لخلق تداخلات جديدة . من الجدير بالذكر أن تحسين كفاءة المركب مـن خلال ثابت التثبيط بالعامل عشرة (١٠) يتطلب طاقة ارتباط إضافية ٥,٨ كيلوجول / مول . تحت الظروف الملائمة فان عمل ولو رابطة إيدروجينية واحدة تعطى ٢٥ كيلوجول / مـول وهذه تماثل أربعة مراتب من القيم فى كفاءة الارتباط والتى تسبب تغيـير المثبـط دقيـق التركيز المولر الى واحد ذات كفاءة تحت النانومولر . لسوء الحـظ فانـه وبـالرغم مـن المعلومات التفصيلية للتفاعل البكتيرى فى مركزه فانه لم يتمكن البحاث من تصميـم مثبـط جديد للنظام الضوئى (II) النباتى باستخدام هذه المعلومات . هذا قد يعكس حقيقة أن النظـام البكتيرى يستطيع أن يزودنا بنموذج خام أولى للنظام النبـاتى ولـو أن التقـارير الحديثـة للطفرات الجديدة قد تساعد فى تنقية وتهذيب النموذج (مـن يريـد المزيـد يرجـع الـى Sinning ، ١٩٩٢) . حديثا نشرت بيانات البللورية الأولية للانزيـم المسـتهدف لمبيـد الحشائش جليفوسات وكذلك انزيم الاينول بيروفوبال شيكيمات فوسفات سينسيز (Stallings وآخرون ، ١٩٩١) والتى قد تفيد فى تصميم الحصول على مثبطات جديدة لهذا الانزيم .



شكل (٣-١٠) : التمثيل بالحاسب الآلى لارتباط يوبى كينون عند موضع الارتباط Qß فى مركز تفاعل Riviridis . اليوبى كينون (UQ1 يظهر بلون أصفر مع الذرات) يظهر مرتبط فى مركز التفاعل . أربعة من الأحماض الأمينية المشتركة فى ارتباط اليونى كينون 190 (His) , (225) gly , (223) ser , (216) phe معلمة إشعاعيا . الروابط الايدروجينية للبقايا الثلاثة الأخيرة موضحة فى لون أحمر .

بالرغم من عدم تحقيق نجاحات حتى الآن فان كفاءة هذا الاقتراب أصبحت واضحة من خلال العمل فى مجال الصيدلانيات . يمكن الرجوع الى أفضل مثال مع انزيم ديهيدروفولات ريدكتاز والذى يعتبر الهدف المعروف والمستقر لكلا المواد المضادة للبكتريا (مثل تراى مثيوبريم) وعلاج بعض أنواع من السرطان (ميثوتريكسات) . دراسة ارتباط التراى ميثوبريم بالانزيم من بكتريا E.coli (تتكاثر فى الشريحة (٣-١١) باستخدام المتناسقات من الانزيم (B ystroff وآخرون ، ١٩٩٠) من مدخل 7 DFP فى اكتوبر ١٩٩٢ من بنك بيانات البروتين (Bernstein وآخرون ، ١٩٧٧) والتى أوضحت أن تداخل فائق مع Arg (57) يمكن الحصول عليه بإضافة المركب الاحلالى -31 carboxyalkyl الى التراى ميثوبريم . تخليق مشتق الكربوكسى بنتوكسى زاد من الكفاءة

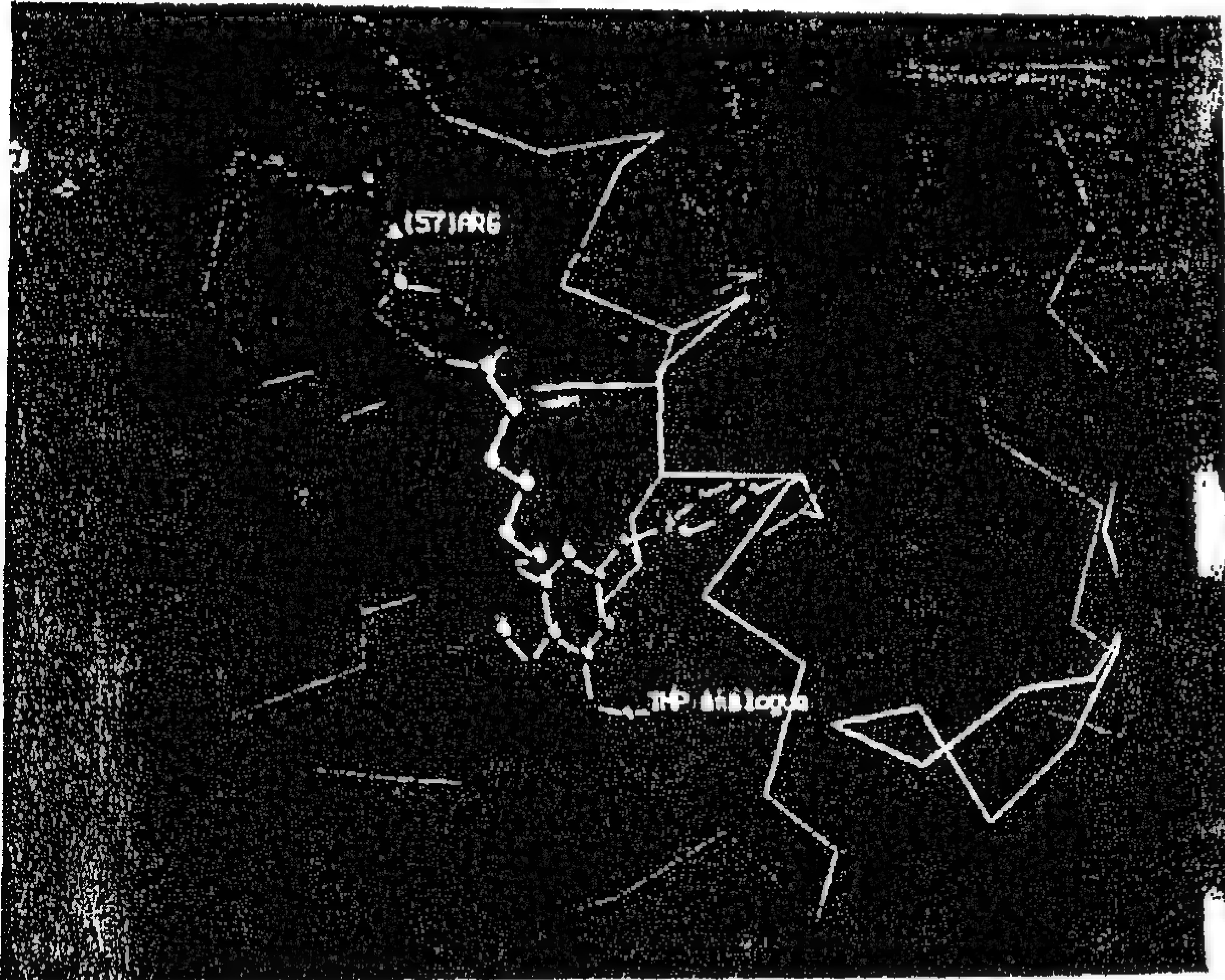
بالعامل ٥٤ Ki للـ PM ٢٤ لمشتق الكربوكسى بنتوكسى بالمقارنة بالعـامل ١,٣ nM لمركب الترامثوبريم . موضح هذا المشتق فى تركيب بللورى للانزيم يوضح أن مجموعـة الكربوكسيل للسلسلة الجانبية قادرة على تكوين روابط ايدروجينية مع Arg (٥٧) كما تنشـأ فى الشريحة (٣-١٢) .



شكل (٣-١١) : التمثيل بالحاسب الآلى لارتباط الترامثيوبريم (TMP) على الموضـع النشـط لانزيـم ديهيدروفولات ريدكتاز . التراى ميثوبريم يبدو مرتبطا على الموضع النشط للانزيم مع بقايا الأرجينين فى الموضع Arg (57) والذى لا يرتبط ولايشترك فى التداخل .

بالرغم من أن ما ذكر أعلاه مع الأمثلة الأخرى تقدم تشجيع للباحثين للعمل على هذا الاقتراب إلا أن هناك حقيقة تتمثل فى أن فهمنا عن تداخلات البروتين والطاقـة الخاصـة بالارتباط غير كافى لعملية تصميم الحصول على مركبات جديدة . هناك مشكلة ذات طبيعة خاصة من جراء مرونة التوجيه والتناسق لكلا المثبط والانزيم والتى تجعل مـن إمكانيـة الحكم على ارتباط المركب مع البروتين أمرا غاية فى الصعوبـة (Jorgensen ، ١٩٩١). هذا معناه أن العملية مازالت تعتمد كثيرا على بيانات حسابية وأن العديد من البحاث فى هذا

المجال مازالوا يتقبلون فكرة ان تصميم الحصول على المثبط من خلال اقـــتراب البلـــورة يتطلب وقت طويل وعمليات متقدمة تتطلب العديد مـــن الفرضيـــات والتخليـــق والتقييـــم بالاختبارات ومعاودة الحكم على الفرضيات . لذلك فان هذا الاقتراب قد يســـتخدم لفـــرض التنبؤ بعمل نموذج لما هو مطلوب كى يتحقق الارتباط بالانزيم من بيانات الـــتركيب عـــن المثبطات والبروتين . يمكن استخدام هذا النموذج فى تعريف المثبطات الجديدة من خـــلال دراسة قاعدة المعلومات عن المركبات التى تصلـــح للارتبـــاط علـــى مواقـــع الارتبـــاط (Desjarlais وآخرون ١٩٨٨) . بالإضافة الى ذلك فان عملية وضع شرائح جزيئية حاكمة من مثبط فى النموذج الخاص بموقع الارتباط يمكن أن يستخدم كذلك فى محاولة الحصـــول على مركبات جديدة باستخدام الحاسب الآلى فى محاولة لاقتراح طرق ربط الشـــرائح فـــى المواضع الصحيحة (لويس ، ١٩٩١) . بالرغم من أن هذه الاقترابات تقدم آفـــاق مبشـــرة واسعة للمستقبل إلا أنه حتى الآن لا يوجد مثال واحد عن نجاح تصميـــم الحصـــول علـــى مركب واحد جديد على المستوى التجارى باستخدام هذا الاقتراب .



شكل (٣-١٢) : تمثيل الحاسب الآلى لارتباط مشتق التراى ميثوبريم (TMP) عند الموقع النشط لانزيـــم دايهيدروفولات ريدكتاز . مشتق الكربوكسى بنتوكسى للتراى ميثوبريم يبـــدو مرتبطـــا على الموقع النشط ويمكنه أن يتداخل مع .Arg (57) لتكوين رابطتين ايدروجين يظهرا باللون الأحمر .

ملائمة المركبات

بالرجوع الى الشكل (٣-٢) يتضح أن ملائمة المركبات القائدة تحتاج الى التنـــاول خلال فترة المشروع . سنحاول فى هذا المقام استعراض كيف أن العمل فى الموائمة يمكــن الاقتراب من خلال خطوات أساسية متتابعة . من الأهمية الإشارة الــى أن كــل دراســات الموائمة ذات طبيعة تكرارية كما تأخذ فى الاعتبار كل المعلومات المتاحة عن كل مرحلة . موائمة صفة واحدة من المركب بمعزل عن الصفات الأخرى لا تمثــل الطــرق الصحيــح لاحراز أى تقدم حيث أنه دوما توجد مقولات ومقارنات عن الصفات المختلفــة المطلوبــة لإحراز نجاحات على المستوى التجارى . لنبدأ بموائمة المركبات البيوكيميائية الرائدة فنقول أن هذا يتطلب تنقية النظرية الأولية التى استخدمت لتصميم الحصول على المثبط . حيــث أنه يوجد متوفرا معلومات ثلاثية الأبعاد وقد تم وصف العمليات التى يتضمنها الاقتراب فــى مواضع سابقة . حيث أن المعلومات عن تقنية عمل الانزيم تعتبر نقطة البداية فان النتـــائج من المثبطات القليلة الأولى يمكن أن تستخدم لتأكيد أو تغيير النظرية الأولى . عنــــد هــذه النقطة تجدر ملاحظة الدور الذى يمكن للبيولوجيا الجزيئية أن تقوم به فى هذه المرحلة مــن خلال الطفرية موجهة الموقع . التحور الاختيارى للأحماض الأمينية التى يعرف أو يعتقــد أنها موجودة عند الموقع النشط من خلال تجارب الطفرية الخاصة يمكن أن تقــدم وســائل جيدة أخرى للحصول على معلومات أكثر عن طوبوغرافية الموضع النشط وكذلك التقنيـــة الكيميائية الفعلية المستخدمة . فى الواقع فان الكثير من العمل المبكر على النظام الضوئـــى (II) كان يعتمد بشكل كبير على تحليل الطفرات التى تحدث طبيعيا (Boger ، ١٩٨٥) .

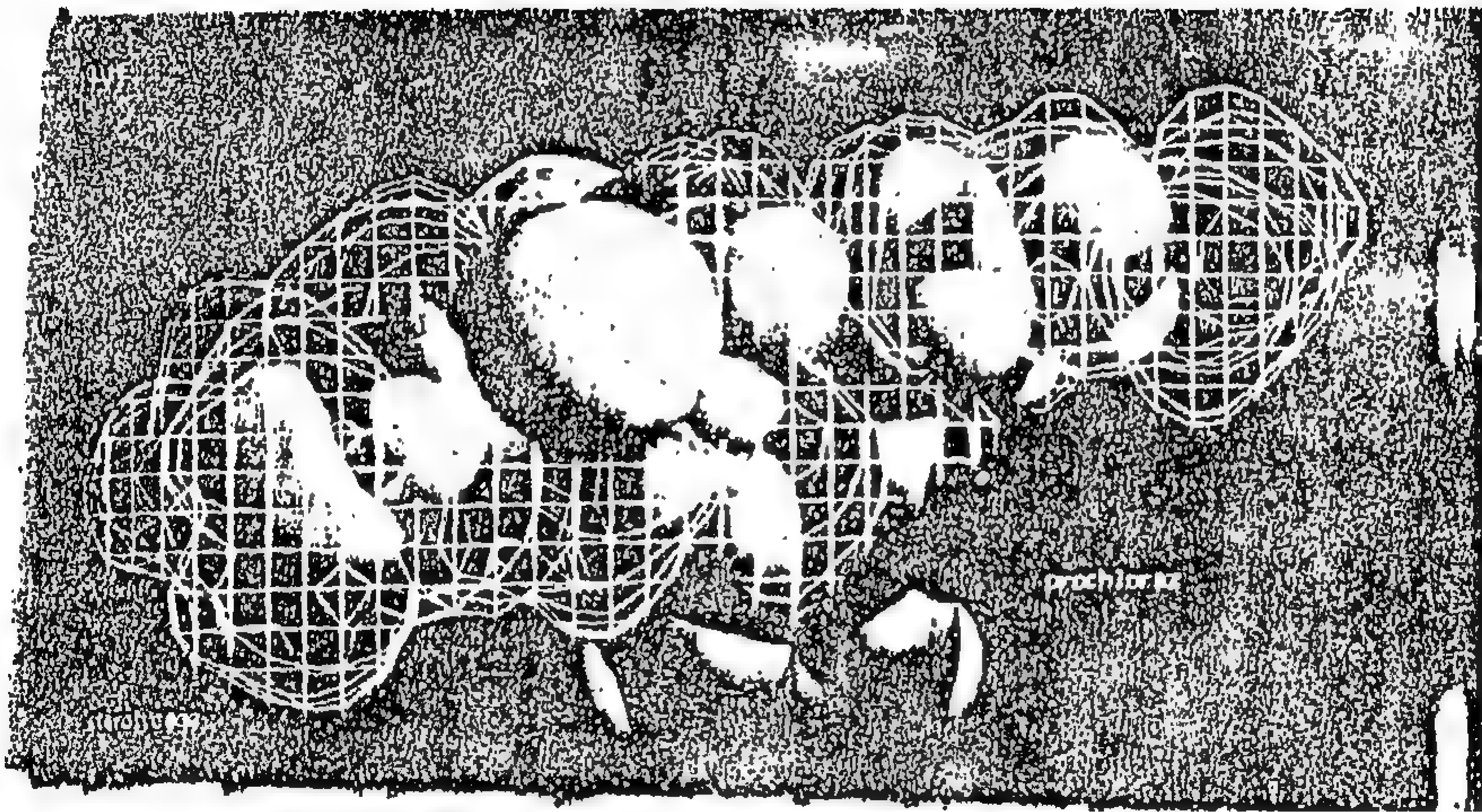
مع تخليق المركبات والحصول على بيانات التثبيط البيوكيميائى فانه يمكـــن عمــل نموذج بالحاسوب الآلى لموقع الارتباط حتى فى غياب أى معلومة إضافية علــى تركيــب البروتين . هذا الاقتراب يمكن من التفرقة من المركبات بناء على قاعدة المعلومات لتعريــف المركبات الأخرى للتخليق بطريق مماثل للذى وصف قبلا مع تصميـــم الحصــول علــى مثبطات باستخدام تركيب البروتين . من أمثلة هذا الاقتراب ما أجرى من عمل على مستقبل الأوكسجين بواسطة الباحث Bures وآخرون ، ١٩٩١ حيث تمكن الفريــق البحثــى مــن تعريف روابط وارتباطات جديدة نشطة فسيولوجيا من خلال دراســة قــاعدة المعلومــات الكيميائية .

النماذج عن كيفية تداخل مجموعة من المثبطات مع هدفها البيوكيميـــائى يمكــن أن تستخدم كذلك لتفريز النتائج الخاصة بالعلاقات بين التركيب البيوكيميائى والفاعلية وكذلـــك اقتراح الطرق والوسائل لتعريف أكثر الاتجاهات تشجيعا لإجراء دراسات وبحوث مستقبلية. لقد استخدم هذا الأسلوب لوضع نموذج عن موضع الارتباط لسلاسل من المركبات النشــطة

ضد الحشائش والتى تعمل من خلال تثبيط انزيم أسيتايل – مرافق انزيمى –أ– كربوكسيليز الذى يشترك فى التخلق الحيوى للحمض الأمينى (Winkler ، وآخرون ، ١٩٨٩) . النموذج يستطيع التمييز بين المركبات النشطة وغير النشطة وقد يثبت فائدته فى وضع نظام لتصميم الحصول على مبيدات حشائش جديدة . لقد استخدمت مجموعات عديدة طرق النمذجة البيولوجية لدراسة الطرق التى من خلالها تستطيع المبيدات الفطرية التى تثبط خطوة المثللة فى الموضع α- 14 فى تخليق الأرجيستيرول أن ترتبط بالانزيم . لقد اتضح من الدراسات المعملية أن مبيد البروكلوراز يتوافق تماما داخل قفص الروابط فاندرفالس لوسيط اللانوإستيرول بأسلوب يجعل أو يحقق ربط النتروجين غير الاحلالى الخاص بحلقة الترايازول يرتبط بالحديد في الموقع النشط (شكل ٣–١٣) . هذا النموذج يوضح بوضوح أى المركبات يتوقع أن تكون فعالة بيوكيميائيا وأيهما يتوقع أن تكون غير فعالة . كما أن النموذج يوضح أى المجالات أكثر تشجيعا وتتطلب إجراء مزيد من الدراسات والبحوث .

أيا كانت النماذج فان البيانات الخاصة بالنواحي البيوكيميائية يمكن أن تستخدم بأسلوب تقليدى مع التحليل الكمى للتركيب لتعريف الصفات العامة المطلوبة لتثبيط الانزيم (هانش وكلين ، ١٩٩١) . لقد استخدم هذا الاقتراب على نطاق واسع كمثبطات النظام الضوئى (II) والاسيتايل كولين استريز . لقد أشار Weiden ، ١٩٦٨ الى أن تخليق مثبطات للأسيتايل كولين استريز أكثر سهولة من تخليق المبيدات الحشرية . بمجرد فهم أى نوع من المركبات مطلوبة لتحقيق مستوى جيد من النشاط البيوكيميائى يصبح من الممكن الاقتراب بشكل أكبر عقلانية من تحديد المشاكل والصعوبات التى تواجه توصيل المركب للموقع البيوكيميائى الخاص به فى الكائن المستهدف . إن الإمتصاص والانتقال الكافى للمركب يعتمد على الصفات الطبيعية الشاملة للمركب مثل حبه للدهون وما إذا كان فيه مجموعة حامضية (Bromilow وآخرون ، ١٩٨٦) . الصفات المطلوبة لتحقيق انتقال فعال تتطلب حسم النواحى الخاصة بتثبيط الموقع البيوكيميائي المستهدف . حتى لو أمكن تحقيق نقل وتوصيل فعال للمركب للهدف فانه ما تزال هناك مشاكل خاصة بانهيار المركب وفقد سميته بواسطة الكائن المستهدف يجب أن تظل فى الذاكرة . فى الوقت الراهن لايكون فى الإمكان التنبؤ الدقيق بكيفية تمثيل المركب بواسطة الكائن المستهدف . الأمثلة الخاصة بمقاومة الكائن للمبيد الحشرى بسبب زيادة التمثيل أوضحت بجلاء أن هذا العامل يعتبر من الحواجز المؤثرة ضد تحقيق النشاط البيولوجى (Devonshire ، ١٩٩١) . فى اتجاه مبيدات الحشائش فان السبب الأكثر شيوعا والذى يجعل من صنف نباتى معين حساس لمبيد حشائش معين بينما الصنف الآخر مقاوم يتمثل فى أن الصنف الأخير ذات مقدرة على تكسير وفقد سمية المركب . لقد حظى هذا الموضوع بمزيد من الاهتمام فى الدراسات

الخاصة بالاختيارية بين استجابة النباتات لمؤثر أو مبيد معين ومن ثم فان فهم اختلاف الكفاءة التمثيلية بين الحشائش والمحاصيل يحقق الهدف المنشود فى الحصول على مركبات متخصصة . من سوء الطالع أن معلوماتنا مازالت ليست بعيدة بشكل كبير عما نخطط له لتحقيق الاختيارية المطلوبة مع أننا مازلنا نعتمد على تخليق أعداد كبيرة من المركبات واختبارها (براون وآخرون ، ١٩٩١) .



شكل (٣-١٣) : التمثيل بالحاسوب الآلى لنموذج البروكلوراز فى حزمة ارتباط اللانواستيرول داخل انزيم ١٤- الفا- ديمسيليز . قطر رابطة فاندرفالز للبروكلوراز موضح ارتباطها فى حزمة فاندرفالز لوسيط الاستيرول العادى بطريق يؤدى الى أن نتروجين حلقة الترايازول للبروكلوراز ترتبط مع الهيم على نفس الموقع للانزيم .

REFERENCES

Abola, E., Bernstein, F.C. Bryant, S.H. Koetzle, T.F. and Weng, J. (1987). Protein Data Bank, in Crystallographic Databases - Information Content, Software Systems, Scientific Appllications, (eds. F.H. Allen, G. Bergerhoff and R. Sievers), Data Commission of the international Union of Crystallography, Cambridge, pp. 107-32.

Aulabaugh, A. and Schloss, J.V. (1990). Oxalylhydroxamates as reaction-intermediate analogues for ketol-acid reductoisomerase Biochemistry, 29, 2824-30.

Baillie, A.C. (1987). Prochloraz and its analogues. Chemistry, mode of action, and biological efficacy, in Synthesis and Chemistry of Agrochemicals, (eds. D.R. Baker, J.G,. Fenyes, W.K., Moberg and B.l cross), ACS Cymposium Series 335, American Chemical Society, Washington, pp. 328-39.

Baillie, A.C., Wright, K., Wright, B.J. and Earnshaw, C.G. (1988). Inhibitors of pyruvate dehydrogenate as herbicides. Pesticide Biochemistry and Physiology, 30, 103-12.

Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J.B. Meyer, Jr. E.F. Brice, M.D., Rogers, J.R., Kennard, O., Shimanouchi, T. and Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank: a computerbased archival file for macromolecular structure. Journal of Molecular Biology, 112, 535-42.

Bionstein, A.D. (1986). Auxotroph isolation in vitro, in A Genetic Approach to Plant Biochemistry, (eds A.D. Bionstein and P.J. King). Springer-Verlag, Wilen, pp. 259-79.

Boger, P. (1985). The photosynthesis membrane as the target of herbicidal action. Plant Research and Development, 21, 69-84.

Bowen, A.R., Chen-Wu, J.L., Momany, M., Young, R. Szaniszlo, P.J. and Robbins, P.W. (1992). Classification of fungal chitin synthases. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 89, 519-23.

Carsel, R.F., Mulkey, L.A., Lorber, M.N. and Baskin, L.B. (1985). The pesticidce root zone model (PRZM): a procedure for evaluating pesticide leaching threats to groundwater. Ecological Modelling 30, 49-69.

Corbett, J.R., Wright, K. and Baillie, A.C. (1984). The Biochemical Mode of Action of Pesticides, 2nd edn, Academic Press, London.

Cramp, M.C., Gilmour, J. Hatton, L.R., Hewett, R.H. Nolan, C.J. and Parnell, E.W. (1987). Design and synthesis of N-(2,4-difluorophenyl)-2-(3-trifluoromethylphenoxy)-3-pyridinecarboxyamide (diflufenican), a novel pre- and early post-emergence herbicide for use in winter cereals. Pesticide Science, 18, 15-28.

Deisenhofer, J. ande Michel, H. (1989). The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium Rhodopseudomonas viridis. Science, 245, 1463-73.

DesJarlais, R.L., Sheridan, R.P., Seibel, G.L., Dixon, J.S., Kuntz, I.D,. and Venkataraghavan, R. (1988). Using shape complementarity as an initial screen in designing ligands for a receptor binding site of known three-dimensional structure. Journal of Medeicinal Chemistry, 31, 722-9.

Devonshire, A.L. (1991). Role of esterases in resistance of insects to insecticides. Biochemical Society Transactions, 19, 755-9.

Elkind, Y., Edwards, R., Mavandad, M., Hendrick, S.A., Ribak, O. Dixon, R.A. and Lamb, C.J. (1990). Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia lyase gene. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87, 9057-61.

Foster, S.G. and Hofgen, R. (1993). Towards a rational design of pesticides, in Opportunities for Molecular Biology in Crop Production (eds D.J. Beadle, D.H.L. Bishop, L.G. Copping G.K. Dixon and D.W. Holloman), BCPC Monograph No. 55, The British Crop Protection Council, Farnham, UK, pp. 75-81.

Gatz, C., Frohberg, C. and Wendenburg, R. (1992). Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV25S promoter in intact transgenic tobacco plants. The Plant Journal, 2, 397-404.

Gottlob-McHugh, S.G., Sangwan, R.S., Blakeley, S.D., Vanlerberghe, G.C., Ko, K., Turpin, D.H., Plaxton, W.C., Miki, B.L. and Dennis, D.T. (1992). Normal growth of transgenic tobacco plants in the absence of cytosolic pyruvate kinase. Plant Physiology, 100, 820-5.

Hansch, C. and Klein, T.E. (1991). Quantitative structure-activity relationships and molecular graphics in evaluation of enzyme-ligand interactions. Methods in Enzymology, 202, 512-43.

Huxley-Tencer, A., Francotte, E., and Bladocha-Moreau, M. (1992). 1(R)-(2,6-cis-dimethylmorpholino)-3(S)-(p-tert-butylphenyl) cyclopentane: a representative of a novel, potento class of bio-rationally designed fungicides. Pesticide Science, 34, 65-74.

Jorgensen, W.L. (1991). rusting of the lock and key model for protein-ligand binding. Science, 254, 954-5.

Kirkwood, R.C. (ed.) (1991). Target Sites for He4rbicide Action, Plenum Press, London.

Koller, W. (1992). Target Sites of Fungicide Action, CRC Press, Boca Raton, FL.

LaRossa, R.L. and Van Dyk, T.K. (1987). Metabolic mayhem causede by 2-ketoacid imbalances. BioEssays, 7, 125-30.

Lewis, R.A. (1991). Rational methods for site-directed drug design: novel approaches for the discovery of potential ligands. Bichemical Society Transactions, 19, 883-7.

Mazur, B.J., Chui, C.F. and Smith, J.K. (1987). Isolation and characterisation of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. Plant Physiology, 85, 1110-7.

McHale, N.A., Kawata, E.E. and Cheung, A.Y. (1990). Plastid distribution in a thiaminer-requiring mutant of Nicotiana sylvestris blocks accumulation of specific nuclear and plstid mRNAs. Molecular and General Genetics, 221, 203-9.

Minet, M., Dufour, M.E. and Lacroute, F. (1992). Complementation of Saccharomyces cerevisiae auxotrophic mutants by Arabutopsis thaliana cDNAs. The Plant fournal, 2, 417-22.

Mol, J.N.M., van der Krol, A.R., van Tunen, A.J., van Blokland, R., de Lange, P., and Stuitje, A.R., (1990). Regulation of plat gene expression by antisense RNA. FEBS Letters, 268, 427-30.

Nagai, A., Ward, E., Beck, J., Tada, S., Chang, J.Y. Scheidegger, A. and Ryals, J. (1991). Structural and functional conservation of histidinol dehydrogenase between plants and microbes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 88, 4133-7.

Pillmoor, J.B., Wright, K. and Lindell, S.D. (1991). Herbicide discovery through rational design: Some experiences, in The British Crop Protection Conference-Weeds-1991, Vol. 2, The British Crop Protection Council, Farnham, pp. 857-66.

Quick, W.P., Schurr, U., Scheibe, R. Schulze, R., Rodermel, E.D. Bogorad S.R. and Stitt. M. (1991). Decreased Rubisco in tobacco transformed with antisense rbcS. I. Impact on photosynthesis in ambient growth conditions. Planta, 183, 452-4.

Rupp, W., Finke, M. Bieringer, H. and Langeleuddeke, P. (1977). Patent Ger. Offen. DE 2717440. (Chemical Abstracts, 88, 70494e).

Sinderson, D.M. and Eamshaw. C.G. (1991). Computer prediction of possible toxic action from chemical structure; the DEREK system. Human and Experimental Toxicology, 10, 261-73.

Scott-Craig, J.S., Panacclone. D.G., Cervone, F. and Walton, J.D. (1990). Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of Cocliobolus carbonum on maize. The Plant Cell, 2, 1191-200.

Smith, C., Watson, C., Ray, J. Bird, C., Movviss, P. Schuch, W. and Grierson, D. (1988). Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes Nature, 334, 427-6.

Trebst, A., and Draber, W. (1979). Structure-activity correlations of recent herbicides in photosyntehetic reactions, in Advances in Pesticide Science, Part 2, (ed. H. Gelssbuhler), Pergamon Press, Oxford, pp. 223-34.

Wagner, C.R. and Benkovic, S.J. (1990). Site directed mutagenesis: a tool for enzyme mechanism dissection. Trends in Biotechnology, 8, 263-70.

Wittenbach, V.A., Aulbaugh, A. and Schloss, J.V. (1991). Examples of extraneous site inhibitors and reaction intermediate analogues: acetolactate synthase and ketol-acid reductoisomerase, in Pesticide Chemistry (ed. H. Frehse), VCH, Weinheim, pp. 151-60.

Wright, K., Pillmoor, J.B. and Briggs, G.G. (1991). Rationality in herbicide design, in Herbicides, Topics in Photosynthesis, Vol. 10, (eds N.R. Baker and M.P. Percival), Elsevier, Amsterdan, pp. 337-68.

الباب الرابع
الاقترابات الجزيئية لتصميم الحصول على مواد حيوية لحماية النباتات

مقدمـــــــــة :

استخدام المبيدات الميكروبية فى مكافحة الآفات الحشرية حجب أو كان فى موقـــف الكسوف لسنوات عديدة بسبب استخدام المبيدات الحشرية الكيميائية لتحقيق الهدف المنشـود. تمثل أنواع البكتريا والفيروس والفطريات وسائل للتطبيق كمبيدات حشرية حيويـــة . لقـد وصفت وعرفت على أنها مركبات " صديقـــة للبيئـــة " Environmentally Friendly products . هذه المنتجات تحقق درجات فى التخصص العوائلى وهـــذا لا يتحقـق مـع المبيدات الكيميائية . هذا الاقتراب يسمح بالقضاء على الآفات الحشـــرية المســتهدفة دون التأثير على الكائنات غير المستهدفة . العيب الأساسى لمواد المكافحة يتمثل فى بطىء الفعل بالمقارنة مع الكيميائيات . لقد تعود المزارعين على استخدام المبيدات الحشرية الكيميائيـــة فى رش المساحات المصابة وبذلك يحصلون على إبادة فورية . فى العـــادة فـان المـواد البيولوجية تتطلب أيام عديدة أو أسابيع لتحقيق نفس مستويات المكافحة . عندما يكون مظهر المحصول ذات أهمية اقتصادية (مثل التفاح) فان أى تلف حتى لو كان قليلا يمكن أن يقلل من قيمة المنتج لمستويات متدنية . لذلك فان استخدام المواد الحيوية قد يمثل مشاكل أكـــثر عن استخدام الكيميائيات . المبيدات الحيوية يجب أن تظل حية حتى ما قبل الرش . التخزين غير السليم والتطبيق فى الظروف غير المناسبة يمكن أن يقلل بشكل خطير فعالية وتــأثير هذه المنتجات . بالرغم من المشاكل المرتبطة بالمواد الحيوية فان الرغبة فـــى اســتخدامها تتزايد سنة بعد أخرى لأسباب عديدة . تكرار استخدام الكيميائيات أدى الى تطور ظـــاهرة المقاومة فى مجاميع الحشرات المستهدفة . الجرعات العالية من الكيميائيات غالبا ما يتكـور استخدامها وهى مطلوبة للحفاظ على تحقيق فاعلية جيدة . هذه السياسة تهدم نفسها بســبب زيادة المقاومة وما يستتبع ذلك من عدم فائدة المركب فى المكافحـــة بعـد ذلـك . تكلفـة الحصول وتطوير أى مركب كيميائى فى ازدياد مستمر والعديد من البلدان لم تعــد علــى استعداد لرفع وتحمل تكاليف هذه المركبات بالعملات الصعبـــة نـادرة الحصــول عليـها وتوفيرها فى هذه البلدان . فى النهاية وخاصة فى الدول الغربية تركـــز جــهات وهيئـات الضغط البيئى تمشيا مع رأى عامة الشعوب فى جميع أنحاء العالم على تكثيف القرائن ضـد المبيدات الكيميائية . بالطبع هناك حاجة الى الحصول على الغذاء مـــن خـلال الزراعـة العضوية بحيث تنتج منتجات خالية من الكيميائيات . إن استخدام وسائل المكافحة الحيويـــة يعد اتجاه مطلوب ومقبول من قبل الجميع .

في هذا المقام سوف نستعرض مواصفات وخصائص واستخدامات المواد الأساسية للمكافحة الحيوية مثار الاهتمام الآن ومن منظور المستقبل مع تناول البحوث والدراسات التي تجري بهدف تحسين فاعلية هذه المركبات . تتضمن المجهودات الجارية استخدام طرق التحوير الوراثية . في المقابل فان تحسين المبيدات الحيوية الطبيعية يتطلب استخدام تكنولوجيات مختلفة ولو أن هناك خصوم لهذا الاتجاه . من الانتقادات التي تواجه التحويرات الوراثية ما يتمثل في خطورة التطبيق العملي وعدم وجود مكان لها في تطوير الزراعة المستقبلية .

البكتريا المرضية للحشرات Entomopathogenic bacteria

هناك القليل من البكتريا المرضية للحشرات أثبتت كفاءة عالية في الاستخدام كمبيدات حشرية حيوية . هناك محدودية وجود ثلاثة أنواع من منتجات الجراثيم مثل Bacillus thuringiensis , B. Sphaericus , B.pogilliae . هناك أنواع بكتيرية أخرى ممرضة للحشرات ولكنها لم تستخدم في المكافحة بشكل محسوس لأنها غير ثابتة العنفوانية وعدم الأمان وتعقيدات التكاثر خارج الكائن الحي . لقد لاقت الباسيلليس ثورينجنيزيس اهتمام الباحثين ورجالات مكافحة الحشرات وسوف يحس القارىء مدى التركيز عليها في هذا المقام . بالرغم من توصيف الجينات المسئولة عن إنتاج التوكسينات المتخصصة في هذه الكائنات الحية إلا أنه برز اقتراح وجود طرق ومسالك ومسارات جديدة تشير الى إمكانية امتداد طريقة الفعل لهذه البكتريا الى بكتريا أخرى مما يجعلها صالحة لكي تستخدم كمواد حيوية لمكافحة الآفات . نقل الجينات من بكتريا باسيلليس ثورينجنسيز الى النباتات لتحسين مقاومة النبات العائل للآفة سوف نتناوله بالتفصيل فيما بعد.

المنظور التاريخي Historical perspective

من الشائع التعبير عن بكتريا الباسيلليس ثورينجينسيز بالاختصار B.t وقد عزل في البداية من يرقات دودة الحرير المريضة وكذلك من فراشة الدقيق في بداية القرن الماضي (إيشاواتا ١٩٠١ ، بيرلنير ١٩١١ ، ١٩١٥) . تكوين الأجسام الباراجرثومية بواسطة البكتريا الموجبة لجرام أمكن تمييزها وتحديدها كذلك في هذا الوقت ولكن طبيعة بلوراتها البروتينية لم تعرف لمدة طويلة بعد ذلك (هاناى ١٩٥٣ ، هاناى وفترجيمس ، ١٩٥٥) . لقد أمكن تعريف وتحديد دور بلورات البروتين في إحداث المرضية للحشرات بواسطة Angus ، ١٩٥٤ .

كيفية إحداث الفعل Mode of action

تحتوى بكتريا .B.T على جينوم ضخم الدنا والذى وبدون شك يخصص قيمة المنتجات الجينية المختلفة . يمكن النظر الى دورة حياة البكتريا فى مرحلتين . هناك مرحلة الانقسام الخلوى الخضرى وهو يحدث فى معظم أنواع البكتريا عندما تكون ظروف النمو مثلى وملائمة . التجرثم يحدث عندما تتغير الظروف البيئية مما يؤدى الى مستويات غذائية مختلفة ومنخفضة أو سيادة حالة من الجفاف . الجرثومة تعتبر مرحلة راحة عندما تسود الحد الأدنى من النشاط التمثيلى ويستطيع الكائن أن يداوم الحياة بشكل لا نهائى . خلال عملية التجرثم ينتج الجاما اندوتوكسين بما يمثل حوالى ٣٥% من الوزن الجاف للخلية لبلورة بروتينية . يحدث إنبات للجراثيم للاستجابة لظروف محسنة فى البيئة ومن ثم تبدأ مرحلة الانقسام الخضرى مرة أخرى . الجراثيم تمكن B.T من الثبات لفترات طويلة من التربة . يبدو أنه يحدث نمو خضرى قليل فى التربة (بيتراس وكاسيدا ، ١٩٨٥ ، اكيب ١٩٨٦) . هناك عزلات في بكتريا .B.t من الحشرات والتربة ومساحيق منتجات الحبوب وأوراق الأشجار المتساقطة والبيئات المائية . بالرغم من عزلات B.t من الحشرات فانه يوجد القليل جدا من الوبائيات المرضية في الحقل (Burgas ، ١٩٧٣) .

البلورة تتضمن بروتين أولى سام ذات وزن جزيئى حوالى ١٣٠ KDa . هذا السم الأولى يذوب فى الوسط القلوى للمعى الأوسط لليرقات ومن ثم تتكسر انزيميا الى السم الفعال ٦٠ – ٧٠ KDa . ينتشر السم خلال الغشاء المبطن للمعى ويرتبط مع المستقبلات الموجودة فى الخلايا الطلائية للمعى الأوسط . يحدث من جراء ذلك شلل فى المعى ومن ثم تتوقف الحشرات عن التغذية (Dulmage وآخرون ، ١٩٧٨ ، سلامة وشرابى ، ١٩٨٥). كان يعتقد أن التوكسين يدخل فى الغشاء مع تكوين ثقوب فى الغشاء (Knowles and Ellar ، ١٩٨٦ ، Ellar ، ١٩٨٩ ، Hendrick وآخرون ، ١٩٩٠). الثقب يتداخل مع أيون البوتاسيوم الداخلى (ساشى وآخرون ، ١٩٨٦) مما يؤدى الى انتفاخ فى الميكروفيلاى (لوثى وآخرون ، ١٩٨٢) . فى النهاية تتحلل هذه الخلايا . تسرب الأيونات من المعى الى الهيموليمف يؤدى الى عدم توازن أيونى فى الهيموليمف . الخلل الذى يحدث فى المعى قد يسمح بغزو الهيموليمف بالبكتريا مما يؤدى الى العفن ثم الموت . التأثير المضاد للتغذية للتوكسين النشط من الملامح الهامة لبكتريا .B.t والمرضية التى تحدثها . بدون هذه النظرية فان البكتريا تنطلق من المعى بواسطة المرور السريع للغذاء .

أمثلة لبكتريا B.t التى استخدمت كوسائل فى مكافحة الآفات

غالبية مستحضرات بكتريا B.t تعتمد على تحت النوع Kurstaki سلالة HD-1 . لقد أنتجت ومازالت هذه السلالات بواسطة بعض الشركات الأمريكية والأوربية (ثومبسون ١٩٨٩) كما هو موضح فى الجدول (٤-١) . هذا المستحضر فعال ضد ١٠٠ من أنواع حشرات رتبة حشرفية الأجنحة . ميزة هذا المركب ذات المدى العوائلى الواسع واضحة حيث يمكن استهداف أنواع حشرية عديدة مع استخدام واحد للمركب . هناك منتجات بكتيرية .B.t أخرى مثل سلاسلة HRD12 لبكتريا Kurstaki B.t جيث يمكن أن تستخدم لاستكمال كفاءة السلالات HD-1 ذات الفاعلية القليلة . حتى الثمانينيات كانت معظم سلالات B.t تستخدم فى مكافحة آفات الغابات . فى شمال أمريكا كانت مبيعات هذه المستحضرات تمثل ٦٠% من السوق العالمى . فى السنوات الأخيرة استخدمت B.t فى مكافحة آفات القطن .

جدول (٤-١) : المستحضرات التجارية لبكتريا B.t

الاسم التجارى	الشركة المنتجة	B.t تحت النوع / السلالة	الحشرات المستهدفة
ديبيل	أبوت كيرستاكى	HD-1	اكثر من ١٠٠ نوع
ثوروسيد	ساندوز كيرستاكى	HD-1	اكثر من ١٠٠ نوع
بيوبيت	نوفوكيرستاكى	HD-1	اكثر من ١٠٠ نوع
جافلين	ساندوز كيرستاكى	HD-1	اكثر من ١٠٠ نوع + دوردة ورق القطن ودودة الشمع

مشاكل استخدام بكتريا B.t كوسيلة مكافحة للآفات

بالرغم من النجاحات الحديثة فى استخدام بكتريا B.t كبديل للمبيدات الحشرية الكيميائية إلا إنها لم تتطور وتثبت وجودها كمبيد بسبب عدد من العيوب . تشمل هذه العيوب المدى العوائلى المتخصص وعدم الفاعلية فى مكافحة الآفات التى تتغذى داخليا أو على الجذور وكذلك فقد الفاعلية السريع على المجموع الخضرى بواسطة ضوء الشمس وغيرها من العوامل البيئية بالإضافة الى الانهيار العالى فى التربة بواسطة الكائنات الدقيقة فى التربة والتأثير الباقى الفعال القليل فى الماء بسبب استقرار الجراثيم والبللورات والادمصاص على الجسيمات العضوية (Gelerntner and Schwab ، ١٩٩٣) .

المحاصيل التى تهاجم بأكثر من نوع واحد من الآفات المستهدف مكافحتها تمثل مشكلة خاصة . العديد من أنواع الآفات الحشرية ليست حساسة لسلالة HD-1 (مثل أنواع ديدان الأوراق) أو من الصعوبة بمكان استخدامها بسبب عادات التغذية (دودة اللوز الأمريكية على القطن) . هذه المشاكل تساهم فى تعميق رفض المزارعين للمحاصيل الرئيسية (القطن – الحبوب – محاصيل الزيت ...) لاستخدام بكتريا B.t كسلاح فى ترسانة مكافحة الآفات بالرغم من التنبؤات المتفائلة والمثيرة بتحقيق سوق تجارى لبكتريا B.t سوف يصل الى ٣٠٠ مليون دولار أمريكى بحلول سنة ٢٠٠٠ وهذا يمثل شريحة صغيرة من السوق الكلى للمبيدات الحشرية الكيميائية .

الاستراتيجيات لتحسين منتجات بكتريا B.t.

أ – **التحور المباشر فى بكتريا B.t** : قد تستخدم طرق عدم دمج الدنا لتحوير جينات التوكسين التى تسكن أو توجد بالبكتريا B.t. . لقد استخدم علاج البلازميد للتخلص وإزالة بعض جينات التوكسين من الكائن الأب ثم يتبع ذلك باحلالها بجينات توكسينات أخرى من خلال نقل البلازميد المقارن (كارلتون وآخرون ، ١٩٩٠، كليير وآخرون ، ١٩٨٣) . لقد أظهرت هذه المنتجات تحسنا واضحا من الفاعلية ضد بعض الحشرات المستهدفة أو مدى عوائلى عريض . تتمثل ميزة هذا الاقتراب فى أنه لا يستخدم الدنا المندمج وتكنولوجياتها كما أنها لا تتوافق مع بعض التشريعات المحددة الخاصة فى هذا الشأن . طرق الدنا المندمج تقدم مرونة أكثر فى تصميم المنتجات المحسنة من بكتريا B.t. . مثال ذلك ما قام به Honet وآخرون (١٩٩٠) من إيجاد جين للتوكسين يحتوى فى المناطق الطرفية النتروجينية على نوعين من التوكسينات الأولية Cryl A(b) ذات الفاعلية ضد دودة براعم الدخان (Heliothis virescens) وأبو دقيق الكرنب الكبير وكذلك Cryl-C ذات النشاط والفاعلية ضد الدودة القارضة . البروتين المندمج المنتج فى بكتريا E.coli ذات فاعلية ضد كل هذه الأنواع الحشرية الثلاثة . التثقيب الكهربى وهى الطريقة التى تستخدم فى إدخال الحمض النووى "دنا" فى الخلايا قد استخدمت إدخال جينات التوكسينات غير المتجانسة فى سلالات B.t. (Crickmore وآخرون ، ١٩٩٠) . فى الوقت الراهن لم يؤدى اقتراب التحوير أو التعديل الجينى الى زيادة متميزة فى مستويات سمية مختلف السلالات . الاستثناء عن هذا القول يتمثل فى إيجاد جين توكسين مهجن بين Cryl A(a) و Cryl A(c) لإنتاج بروتين ذات سمية لدودة اللوز الأمريكية أكثر بمقدار ٣٠ مرة (Ge وآخرون ، ١٩٩١) .

ب– **الكائنات الدقيقة المحورة وراثيا المحتوية على جينات B.t.** : مشكلة الآفات الحشرية المستهدفة التى تتغذى داخليا أثارت اهتمام البحاث مما دعاهم لإدخال جين B.t.

فى البكتريا التى تستعمر النظام الوعائي للنبات . هذه الكائنات الدقيقة تعرف endophytes تعمل على إدخال وتوصيل التوكسين لمكان إحداث الفعل المطلوب . لقد قامت المؤسسة الدولية للوراثية النباتية فى أمريكا بإدخال نسخة فردية من جين .B.t كيورستاكى . جاما - اندوتوكسين كريل A(c) فى كروموسوم بكتريا كلافيباكتر زايلى تحت النوع سيانودنتس (In Cide ®) (Beach ، ١٩٩٠) . لقد تم حقن بذور الذرة بالبكتريا C.xyli المندمج المحتوى على جين .B.t الوظيفى لإنتاج نباتات تستعمر بواسطة البكتريا . لقد استخدمت هذه النباتات على نطاق صغير فى التجارب الحقلية فى أمريكا للكشف عن مدى مكافحة ثاقبة الذرة الأوربية " أوسترينيا نوبيلاللس . لقد تم تحقيق مكافحة متوسطة لهذه الآفة . فى محاولة لزيادة ثبات الاندوتوكسين للبكتريا B.t على المجموع الخضرى تم إدخال البلازميد المحتوى على جينات اندوكسين .B.t فى البكتريا غير الممرضة التى تستعمر الأوراق " بسيدوموناس فلوريسنسيز " . الخلايا المندمجة للبسيدوموناس تنمو فى أجهزة التخمر . هذه الخلايا تقوم بتخليق الاندوتوكسين الذى يتراكم كبلورات ويصل لمستويات ١٠-٢٠% من البروتين الكلى فى الخلايا . فى نهاية التخمر يتم حصاد الخلايا البكتيرية المتلامسة (بارتز وكنج ، ١٩٨٧) . يبقى الاندوتوكسين محميا داخل العائل على خلاف بكتريا .B.t الطبيعية التى تتحلل فى نهاية دورة التضاعف لأفراد وتحرير الجراثيم والاندوتوكسين غير المحمى . لقد تم تطوير هذه التكنولوجيا بواسطة مؤسسة Mycogen فى أمريكا تحت الاسم التجارى ® Cell Cap . لقد تكون عدم يقين لتتابع اطلاق الكائنات الدقيقة الحية المندمجة فى البيئة فان بكتريا بسيدوموناس المحورة وراثيا تفقد فعاليتها بواسطة التثبيت . لقد استخدمت هذه الخاصية لعبور بروتينات جدر الخلايا .

مكافحة الآفات الحشرية التى تسكن التربة

توسيع مظلة استخدام بكتريا .B.t فى مكافحة الآفات الحشرية التى تسكن التربة جوبهت بعوائق بسبب عاملين رئيسين . الأول أن الجاما - اندوتوكسينات تنهار بسرعة فى الأرض . الثانى يتمثل فى أن وبسبب اختباء الحشرات المستهدفة داخل التربة يصبح من الصعوبة إدخال مستحضر بكتريا .B.t بأسلوب فعال . الإجابة عن هذه المشاكل تماثل ما يحدث مع الاقتراب المستخدم فى نشر اندوتوكسين .B.t مع ثاقبات الأوراق . لقد تم تعريف الكائنات الدقيقة التى ترتبط بجذور النباتات الحقلية . لقد تم تحوير البكتريا لتعبير جينات الاندوتوكسين للبكتريا .B.t ومن ثم إرسال التوكسين للمواقع التى عندها تؤثر على الآفات الحشرية . مثال ذلك جذور الذرة التى تستعمر بسيدوموناس المندمجة أنتجت وهى محتوية على جين اندوتوكسين Cryl A (b) (Obvkowicz ، ١٩٨٧) . يوجه الجين مستهدفا كروموسوم البكتريا لمنع الحركة والنقل للكائنات الدقيقة غير المستهدفة . لقد تأكد إنتاج

التوكسين وثبت تأثيره على يرقات دودة قـــرون الدخـــان " ماندیوكاسیكســـتا " . البكتريـــا المندمجة لم تختبر إطلاقا على المستوى الحقلى . فى دراســـة مشـــابهة قـــام Waalwijk وآخرون ، (١٩٩١) بتحوير سلالة بسيدوموناس بإدخال جين نشط فى إنتاج الاندوتوكســـين Cryl VB من رتبة ثنائية الأجنحة فى الكروموسوم . لقد تم تعميم هذه البكتريا المندمجـــة كى تؤثر على اليرقات الخاصة بذبابة Tipula oleracea . هذه الحشرة تسبب تلف خطير للحشائش . لقد تأكد تعبير التوكسين النشط من خلال التقييم الحيـــوى علـــى يرقـــات هـــذه الحشرة. لقد حدث قتل من ١٠-٣٠% من الحشرات المختبرة بواسطة التوكسين مما يوضح مستوى منخفض نسبيا من التخليق .

لقد أمكن تحقيق الحماية الجزيئية لنباتات البسلة باستخدام البكتريا المحورة وراثيـــا التى تعبر عن جينات اندوتوكسين بكتريا B.t . هذا المحصول من المصادر الهامة للبروتين فى البلدان الاستوائية . التعقد بواسطة أنواع برادى ريزوبيوم تمكن النباتات من النمو فـــى الأراضى الفقيرة . لسوء الحظ فان يرقات ثنائية الأجنحة Rivella angulata تؤدى الـــى خفض الإنتاجية من خلال التغذية على محتويات العقد الجذرية للبسلة . لإحداث هذا السلوك فى يرقات الحشرة تم إنتاج ريزوبيم مندمج يحتوى على جين Cryl VD الفعال ضد أنـــواع حشرات ثنائية الأجنحة (Nambiar وآخرون ، ١٩٩٠) . استخدام هذه البكتريا المحـــورة تقلل من الإصابة بهذه الآفات على البسلة بمقدار ٤٠% .

تقنيات مقاومة الحشرات لاندوتوكسينات بكتريا B.t.

استخدام المبيدات الكيميائية فى مكافحة مجاميع الحشرات أدى الى حـــدوث تطـــور متفاوت فى مقاومة الآفات لهذه الوسائل . لقد سجل الباحثان جورجيو ولاجيونز (١٩٨٨) ما يزيد عن ٥٠٠ نوع من الحشرات مقاومة لكل أقسام المبيدات الحشرية . فى الجانب الآخـــر أدى استخدام المركبات المبنية على B.t. الى تحقيق بدائل فى المكافحة ويعتقد أنـــه بســـبب طبيعة هذه المستحضرات الحيوية فأنها أقل ميلا لتكوين سلالات مقاومة ضدها مـــن قبـــل الحشرات المستهدفة . مستخدمى مستحضرات بكتريا B.t. فى مكافحة الآفـــات الزراعيـــة والغابات حريصين على عدم الإسراف فى استخدام هذه المستحضرات ذات القيمة والتكلفـــة العالية . بالرغم من ظهور حالات قليلة من مقاومة الحشرات لبكتريا B.t. بعد اســـتخدامها فى الحقل فى الثلاثين سنة الأخيرة وهى لا تمثل اكثر من ١% من السوق العالمى للمبيدات. لقد اكتشف كينسنجر وجاوهاى ، ١٩٧٩ زيادة ٤٢ مرة فى مقاومة حشرة فراشـــة الدقيـــق الهندية المرباة فى المعمل للمستحضر البكتيرى ديبيل عندما قورنت بالسلالات الحقلية لنفس الحشرة. الدراسات اللاحقة التى تم فيها إنتخاب مجاميع الحشرات لتحديد المقاومة لبكتريـــا B.t. أظهرت حدوث خفض فى الحساسية بمقدار ٢٧ مرة بعد جيلين فقط وخفض مقـــداره

٩٧ مرة بعد ١٥ جيل (ماجاهاى ، ١٩٨٥) . لقد اعتبرت هذه الدراسات ممثلة لظروف قاسية بسبب التعريض المستمر للحشرة الى مستحضر بكتريا B.t فى تجربة فريدة عن تطور المقاومة للبكتريا فى الفراشة ذات الظهر الماسى التى تغذت على غذاء معامل بمستحضر الديبيل على مدى ٤ سنوات ثم أوقفت المعاملة لمدة ٧ سنوات قبل معاودة البرنامج باستخدام مستحضر B.t. Havelin(K) . هذه المناطق التى حدث فيها تكثيف فى استخدام بكتريا B.t. أدت الى ظهور حشرات أقل حساسية بمقدار من ٢-٣٣ مرة . لقد كان نسبة الموت التى سجلت تحت الظروف الحقلية لا تتعدى ٣٠% بينما كانت نسبة الموت فى المعمل من ٩٠-١٠٠% . من الأمور المثيرة للدهشة أن مقاومة السلالات الحقلية من الحشرات لبكتريا B.t. نقصت بشكل ملحوظ عندما أوقفت المعاملة بالمبيدات الحشرية .

الفطريات الممرضة للحشرات Entomo pathogenic Fungi

نظرة ومنظور تاريخى

دور الفطريات الممرضة للحشرات فى إحداث المرض فى الحشرات عرف فى بداية القرن التاسع عشر من دراسات على دودة الحرير . لقد تمكن الباحث Metschnikoff ، (١٨٧٩) والباحث Krassil stchik ، (١٩٨٨) فى إنتاج الفطر M.anisopliae لمكافحة الذبابة البيضاء فى القمح A.austriacea ودودة بنجر السكر C.purctiventris . بالرغم من التشاؤم الذى ساد فى البداية تجاه هذه التكنولوجيا فان إدخال مبيدات حشرية رخيصة وفعالة زاد من الاهتمام باستخدام الفطريات الممرضة بنفس الطريقة والأسلوب ان لم يكن أكثر كتلك التى اتبعت مع الوسائل الحيوية البكتيرية والفيروسية فى المكافحة . فى السنوات الحديثة حدثت عودة للاهتمام بأهمية دور هذه المستحضرات بعد أن تفاقمت المشاكل من جراء استخدام المبيدات الحشرية على البيئة بالإضافة الى ارتفاع التكلفة . من سوء الحظ فان الفطريات الممرضة للحشرات لا تمثل جزء كبير من سوق المبيدات ولكن لها مستقبل ضمن استخدامات خاصة مع التكامل مع الوسائل الأخرى لمكافحة الآفات . التطور المذهل والسريع فى مجال البيولوجيا الجزيئية دفع منظور ومفهوم الحصول على مبيدات حشرية أكثر فاعلية ضد الحشرات . بالرغم من الصعوبات الكبيرة فى تعديل وتحوير الفطريات الخيطية الممرضة للحشرات فان التقدم الكبير الذى حدث أدى الى الاقتراح بإمكانية الحصول على سلالات وراثية معدلة . على المدى القصير لا يلوح فى الأفق الحصول على مبيدات حشرية فطرية ولكن يكون فى الإمكان إجراء تحليل للمرضية والعوامل المسئولة عن العنف .

كيفية إحداث الفعل

على خلاف طريق العدوى عن طريق الفم للبكتريا والفيروسات الممرضة للحشرات فان الفطريات المرضية للحشرات ذات مقدرة للاختراق المباشر للجليد الخارجي. يحتوى جليد الحشرة على ليفات كيتنية داخل مادة أو وسط البروتين مع الليبيدات والشموع وكميات صغيرة من الفينولات والمواد غير العضوية والصبغات . المقدرة على التأثير على اختراق الكيوتيكل عامل محدد حيث أن الفطريات التى تعانى من عدم وجود تقنيات الاختراق تكون قادرة على إحداث المرض فى الحشرات العملية تتضمن تقنيات انزيمية وطبيعية .

الفطريات الناقصة تنتج كونيديا (جراثيم) تتوزع عشوائيا بواسطة الرياح والماء . هذه التراكيب فى حال ملامستها لجليد الحشرة يجب أن تلتصق وتظل فى تلامس مع السطح بما يسمح بالإنبات ثم الغزو (Charnley ، ١٩٨٤) . القوى الكارهة للماء غير المتخصصة يحتمل أن تلعب دورا فى التصاق الكونيديا . هناك تقنيات أخرى مثل الجليكوبروتينات والانزيمات المتخصصة قد يكون لها دور معنوى وإيجابى . لقد اقترح ذلك فى التقارير العلمية التى أشارت الى أن بعض السلالات الفطرية تنتج كونيديا ترتبط فقط ببعض أنواع الحشرات . هذا قد يتضمن استخدام الانزيمات المحللة للكيوتيكل أو يتحقق ذلك من خلال القوى الميكانيكية . هناك مجموعة من الانزيمات قد تنتج لمساعدة اتمام هذه العملية مثل البروتيزيس ، الكيتينسزيس ، والليبيزيس (Charnley and st leger ، ١٩٩١) .

بمجرد اختراق الممرض الفطرى لجليد الحشرة فأنه يميل الى التوزيع والانتشار خلال الحشرة مكونا شبكة من تراكيب الهيفات . الحشرة لا تستطيع أن تفلت من هذه التراكيب وتموت . فى المراحل النهائية من العدوى فان الفطر ينتج كونيديا أكثر تتحرر وتنتشر لنشر العدوى لعوائل أخرى . من العوامل الأخرى التى تلعب دورا فى موت العوائل الحشرية مثل التوكسينات ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة التى تنتج بواسطة الفطريات الممرضة للحشرات . تشمل هذه التوكسينات البوفاريسين والديستروكسين . ينتج البوفاريسين بواسطة فطر بوفاريا بوزيانا وهو مكون من hexadepsipelatide به ثلاث وحدات متكررة من حامض D-2- hydroxyisovaleric مرتبط بالحمض الامينى ن- ميثيل فينايل الانين . لقد تأكد دور الديستروكسين فى إحداث المرضية الفرضية عن طريق الحقن فى يرقات حشرات حرشفية الأجنحة والحشرات الكاملة لثنائية الأجنحة مما يسبب الشلل والموت (صمويل وآخرون ، ١٩٨٨) . لقد تم عزل كميات قاتلة من الديستروكسين فى حشرات M.anisopliae المصابة (سوزوكى وآخرون ، ١٩٧٠) .

أمثلة عن الفطريات المرضية للحشرات كوسائل فى مكافحة الآفات

كما هو الحال مع الفيروسات والبكتريا الممرضة للحشرات فان الفطريات المرضية للحشرات لاقت انتشارا وتوزيعا واسعا على مستوى العالم . فى الوقت الراهن تم تعريف مئات عديدة من الأنواع تنتمى لحوالى ١٠٠ جنس ومع ذلك يستخدم ٢٠ نوع فقط من الفطريات فى مكافحة الآفات الحشرية . الفطريات الناقصة تحتوى على أكبر عدد من الأنواع الممرضة للحشرات . من الأمثلة الواضحة عن هذه المجموعة أنواع البوفاريا باسيانا ، بوفاريا برونجنيارتى ، بوفاريامیتاريزيوم حيث تعتبر هذه الأنواع مبيدات بيولوجية . الفطر بوفاريا بوسيانا الممرض للحشرات تستخدم فى العديد من البلدان خاصة روسيا والصين . يتم إنتاج الفطر على نطاق واسع لمكافحة عدد من الآفات الحشرية من رتبة حرشفية الأجنحة وصانعات الانفاق (فرانز وكريج ، ١٩٨٠ ، هوسى وتنسلى ، ١٩٨١) . فى الصين يستخدم الفطر مع جرعات واطية من المبيدات الحشرية . فى أوربا استخدم النوع B.brongniarti (فيرون ، ١٩٧٨ - كيلر ، ١٩٨٣) لمكافحة حشرة الخنفساء البيضاء M.melolontha . لقد كانت التربة تعامل بالكونيديات أو كانت الحشرات الكاملة ترش بالجراثيم البلاستيدية . لقد أدت هذه المعاملات الى استقرار المرض فى مجموع الآفة وما يستتبع ذلك من موت فى الأجيال التالية . لقد أكدت هذه النتائج الطبيعة ذات المدى الطويل للمكافحة وعدم إمكانية تحقيق الشلل السريع knockdown فى مجموع الآفات باستخدام هذه المستحضرات الفطرية على خلاف ما يحدث مع المبيدات الحشرية الكيميائية .

الفطر M.anisopliae من الوسائل المبشرة جدا فى مكافحة العديد من أنواع الآفات الحشرية . بالتوازى مع نجاح الفيروسات ضد دودة الفول القطيفية فقد استخدم فى البرازيل لمكافحة الحشرات مثل M.posticata (فيرون ، ١٩٨١) وهى آفة تصيب المراعى وبنجر السكر . لقد استخدم الفطر فى عدة آلاف من الهكتارات وكانت النجاحات فائقة عما كان متوقعا مما أدى الى خفض ١٨% من المساحات التى كانت تعامل بالمبيدات (ريسكو ، ١٩٨٠) . فى جزر الباسفيك وجنوب شرق آسيا استخدم الفطر فى مكافحة خنفساء O.rhinoceros وهى من اخطر آفات النخيل . لقد استخدم المركب فى توافق مع الفيروس (بيدوفورد ، ١٩٨٠) . بالإضافة الى استخدام الفطر ضد الآفات الحشرية التى تصيب الأسطح النباتية فأنها استخدمت ضد آفات التربة . من هذه الأمثلة حشرة المراعى A.tasmariae فى استراليا (كولز وبينوك ، ١٩٨٢) وخنفساء العنب السوداء O.sulcatus فى أوربا (زيمرمان ، ١٩٨٢ ، ١٩٨٦) . لقد أعتبر مستحضر الفطر على نفس كفاءة المبيدات فى مكافحة الحشرات . لقد أظهرت بعض الاختبارات فى استراليا

فاعلية الفطر ضد النمل الأبيض (هـانيل وواطسـون ، ١٩٨٣) . لقـد اسـتخدم فطـر Verticill um lecanii فى أوربا لمكافحة المن والذباب الأبيض فى الصوب الزراعيـة . لقد ثبت أن فترة الحضانة لهذا المرض حوالى عشرة أيام ومن ثم يجب أن يقدم الممـرض فى مجموع الآفة فى مرحلة مبكرة قبل حدوث تلف أو ضرر محسوس للنبـات العـائل . بمجرد استقرار الفطر سوف يستمر فى تحقيق مكافحة فعالة لعدة أسابيع لاحقة . قد يستخدم فى مكافحة المن على المحاصيل الغذائية مثل الخيار والباذنجان (Hall ، ١٩٨١) . قـد تعطى الكونيديا والجراثيم البلاستيدية نفس الفاعليـة ولكـن الأخـيرة غـير ثابتـة (Hall ١٩٨١،).

المشاكل التى تجابه الفطريات الممرضة للحشرات كوسائل فى مكافحة الآفات

كما هن الحال مع البكتريا والفيروسات فان فاعلية الوسائل الفطرية للمكافحة الحيوية للآفات تتحدد بواسطة الظروف البيئية خلال وبعد استخدام المبيدات . فـى العـادة يكـون متوسط درجة الحرارة المناسبة للفطريات تقع ما بين ٢٠ – ٢٥ م . بالنسبة لأكـثر أنـواع الفطريات المرضية ضد الحشرات فاعلية كانت الحرارة الملائمة تقع ما بيـن ١٥-٢٥ م . درجة حرارةا لصوب أعلى من ٣٥ م وهى غالبا عامل محدد لنمو الفطر خاصة فى فـترة النمو الخضرى . لقد أشار زيمرمان (١٩٨٢) أن مقاومة فطر M.anisopliae لدرجـات الحرارة المرتفعة تزداد مع زيادة الرطوبة النسبية . فى الغالب تساهم الرطوبة النسبية بشكل كبير على كفاءة الفطريات المرضية للحشرات . الظروف الرطبة تلائم تطور الكونيديا التى حدث لها إنبات . مثال ذلك فان كونيديا الفطر M.anisopliae تتوقف عن الإنبات فى ظـل رطوبة نسبية أكثر من ٩٤% (Walstad وآخرون ، ١٩٧٠) . لقد أدت هذه النتائج الـى الاقتراح بأنه إذا لم تكن الرطوبة النسبة عالية فان الفطريات المرضية للحشرات قـد تفقـد فعاليتها فى مكافحة الآفات الحشرية .

الأشعة فوق البنفسجية ذات دور كبير ورئيسى فى تحديد نصف فترة حياة العـدوى بكونيديا الفطر ولا يحدث ذلك مع المستحضرات البكتيرية والفيروسية الممرضة للحشرات. فى التجارب التى تناولت اختبار مقاومة الفطريات والفيروسات والبكتريا اتضح أن كونيديـا الفطر B.bassiana كانت اكثر مقاومة للأشعة فوق البنفسجية (زيمرمان ، ١٩٨٦) . فـى النهاية فان بطىء إحداث القتل بواسطة الفطريات المرضية للحشرات يظل عامل محدد فـى نجاحها فى المستقبل كوسائل حيوية فعالة فى المكافحة . بعد الغزو الأولى لجسم الحشـرة العائل تستمر الآفة فى التغذى وإحداث الضرر . إذا لم يحدث تقليل أو تقصير لفترة الراحـة

عند العدوى بالفطريات فان الفلاحين لن يستمروا فى اختيار هذه الوسائل الحيوية لمكافحة الآفات الحشرية فى مزارعهم ولكنهم سوف يستمرون فى استخدام المبيدات .

استراتيجيات تحسين كفاءة الفطريات المرضية للحشرات كمبيدات

هناك اقترابان لتحسين فاعلية الفطريات الممرضة للحشرات . يتضمن الأول دمج جنسى أو باراجنسى لتبادل الصفات الوراثية المناسبة فى مكافحة الحشرات ما بين السلالات الوراثية الفطرية . الاقتراب الثانى يتناول استخدام الهندسة الوراثية لتحوير الممرضات الفطرية للحشرات . التهجين عبر الدورة الجنسية قد يفيد مع بعض الفطريات التى تستخدم كوسائل حيوية فى المكافحة ولكن الفطريات M.anisopliae و B.bassiana ليس لهما دورات جنسية . الدمج خلال الدورة الباراجنسية سجلت وفيها يتكون كاريونات غير متجانسة انتقالية من خلال الالتحام أو الاندماج البروتوبلاستى . بعد ذلك فان الدمج النووى النادر قد يقلل من النويات الثنائية غير المتجانسة . الأنوية المزدوجة غير ثابتة حيث تتكسر الى لأنوية وحيدة ثابتة من خلال فقد الكروموسوم خلال الانقسام الميتوزى . الدمج الوراثى يحدث بواسطة العبور الميتوزى بين الكروموسومات المتجانسة فى الأنوية الثنائية أو الوحيدة الكروموسومات أو من خلال الانعزال الكروموسومى خلال اقتراب التهجين الباراجنسى بين سلالات الفطر M.anisopliae المرضية يؤدى الى تكوين طفرات ذات معدلات تجرثم مختلفة والمرضية تجاه الحشرة Nilaparvata (Heale وأخرون ، ١٩٨٩) . عدم التوافق الخضرى يقيد التغيرات الوراثية بين السلالات الفطرية غير المرتبطة . عدم التوافق قد يتغلب عليه باستخدام تكنيك دمج البروتوبلاست (جاكسون ، ١٩٨٨) .

استخدام الهندسة الوراثية يتطلب طرق لإدخال " دنا خارجى " فى جينيوم الفطر . طرق وخطوات تحول " الدنا " للفطريات الخيطية تعتمد على إضافة "الدنا" للبروتوبلاست فى وجود الكالسيوم $^{2+}$ والبولى ايثلين جليكول . تكرار حدوث التحول منخفضة (٠,١-١٠ تحولات لكل ميكروجرام دنا) . إذا كان الدنا المتحول قادرا على التضاعف الذاتى قد يحدث نقص مقداره من ١٠,٠ - ١٠,٠٠٠ متحولات لكل ميكروجرام . لقد فسرت المقاومة للبنوميل فى فطر M.anisogline بالتحول الوراثى (Bernier وأخرون ، ١٩٨٩) . تحليل الدنا الجينومى من السلالات الفطرية المتحورة أظهرت أن معظم المتحولات تحتوى على تتابعات متكررة للناقل بما يحدث من إدخال فى الكروموسومات . على المدى الطويل فان استخدام الهندسة الوراثية تقدم فرصة لإدخال الجينات التى تشفر وتوجه العوامل المسئولة عن المرضية مثل الانزيمات المسئولة عن تخليق الكيتين فى الحشرات فى السلالات الفطرية البديلة . فى الوقت الحالى توجد معلومات متوفرة عن

أدوار الانزيمات أو التوكسينات فى طريق المرضية الشاملة للعدوى بالفطريات . تعريف هذه الأدوار يتطلب تطوير مدى من الطفرات المرضية التى تعانى من نقص واحد أو أكثر من الجينات التى تتحكم فى عوامل المرضية . حيث أن الفطريات الناقصة لا تملك مرحلة جنسية يصبح من غير الممكن عمل تحليل وراثى تقليدى . لحسن الحظ فان تطور طرق التحول الفطرى للفطر M.anisopliae (Gotte وآخرون ، ١٩٩٠) سوف تسمح بعزل العديد من جدينات العنفوانية . هذه قد تتغير فى الخارج قبل إدخالها فى جنيوم الفطر لاستكشاف التأثير .

الفيروسات الممرضة للحشرات Entomopathogenic viruses

لقد نشر أن الحشرات حساسة لمدى من العدوى بالفيروسات (King وآخرون ، ١٩٩٤) . الفيروسات على خلاف البكتريا طفيليات إجبارية لأنها تعتمد على إتاحة وتوفر خلايا العائل المناسبة لاستمرار التكاثر . العديد من الفيروسات أمكن تعريفها والكشف عنها فى العوائل الحشرية . هذه تشمل فيروسات الباكولوفيروس (كبيرة – مرتبطة بروابط اشتراكية – جينومات دائرية الدنا) ، بوكسى فيروسات (كبيرة – خطية – جينوم ذات دنا مرتبط اشتراكيا) ، فيروسات البولى هيدروسيز السيتوبلازمية (ذات حلقات – جينوم دنا ثنائى الشرائط) ، بيكورنافيروس (صغير – جينوم رنا فردى الشرائط) . من الواضح أن العديد من الأمثلة التى يشار اليها ترتبط بفيروسات متشابهة التى تسبب المرض فى الإنسان والثدييات الأخرى . عائلة (B aculoviridae) واحدة من أكثر عائلات الفيروسات التى ترتبط بأنواع اللافقاريات . لقد جعل هذا الوضع من هذه الفيروسات وسيلة حيوية جيدة لمكافحة الحشرات لأن احتمالات نقل العدوى الى الثدييات ضئيلة للغاية . لقد أدى اكتشاف البيولوجيا الجزيئية الى تسهيل تحوير الجينومات لهذه الفيروسات . سوف نركز فى هذا المقام على الباكولو فيروسات للحصول على مبيدات حشرية فعالة بتكاليف معقولة .

الباكولو فيروسات Baculoviruses

المنظور التاريخى : لقد أمكن تمييز أعراض العدوى بالباكولوفيروسات فى الحشرات بداية من ديدان الحرير فى القرن السادس عشر ولو أن سبب المرض لم يكن معروفا فى ذلك الوقت . فى القرن التاسع عشر تم الربط بين وجود البللورات التى تحدث انكسار للضوء أو الأجسام الفيروسية والعدوى . فى عام ١٩٤٧ قدم Bergold أدلة تؤكد الطبيعة الفيروسية للمرض . بعد ذلك أجريت دراسات متعددة وجميعها أشارت الى كفاءة ومقدرة الباكولوفيروسات فى مكافحة العديد من الممرضات الحشرية (Ignoffo ، ١٩٧٣). لسوء الحظ كما هو الحال مع العديد من الوسائل الحيوية للمكافحة فان اكتشاف مبيدات

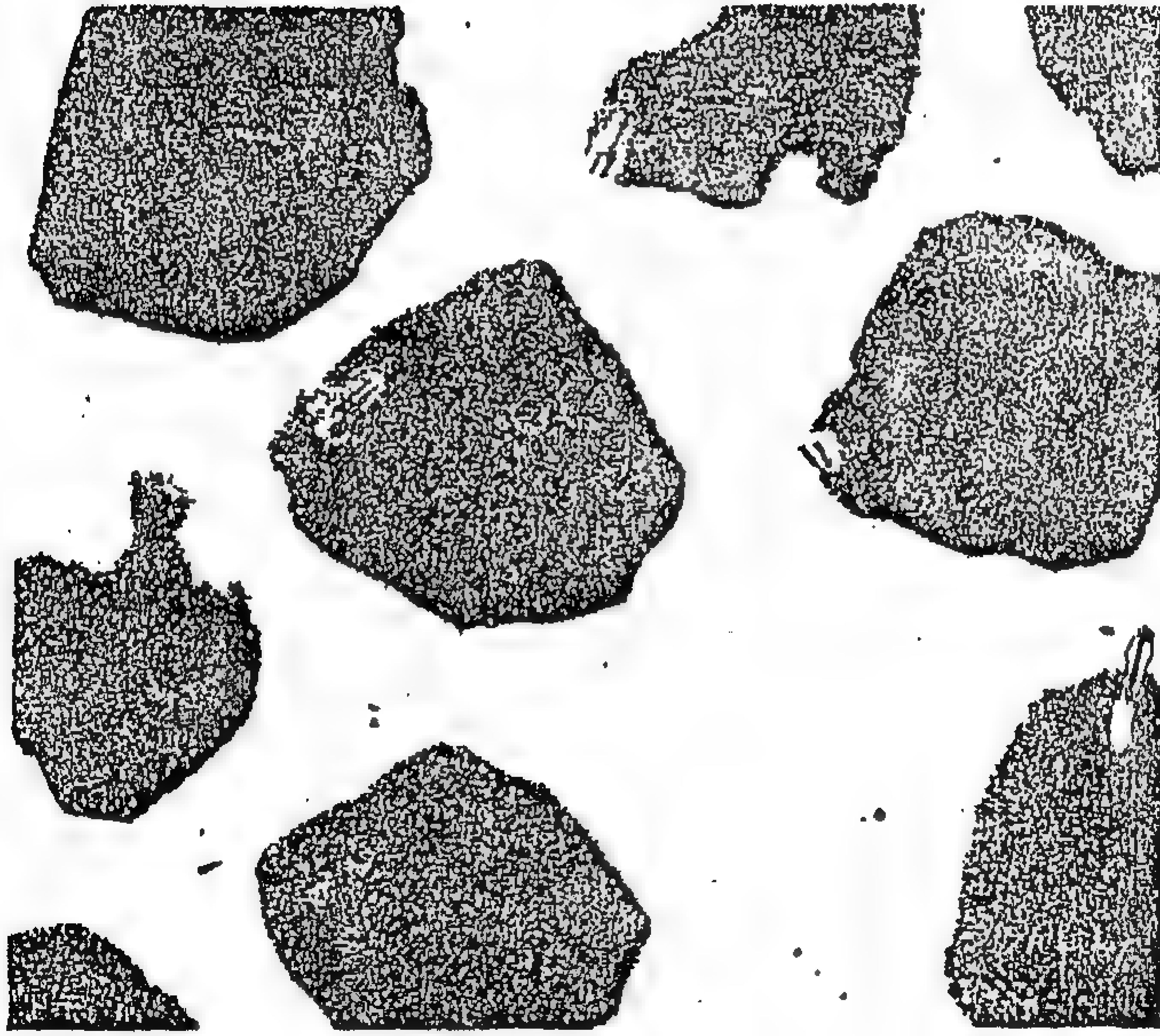
حشرية مخلقة فعالة ورخيصة يمكن بالموت على مستقبل الباكولوفيروسات كمركبات حيوية مكلفة . لقد أمكن عزل الباكولوفيروسات من أكثر من ٦٠٠ نوع من الحشرات بما فيها رتب حرشفية الأجنحة وغشائية الأجنحة ورتب ثنائية الأجنحة .

كيفية إحداث الفعل : الباكولوفيروسات لها جينوم دنا كبير وثنائي الاشرطة ودائوى (حوالى ٨٠-٢٠٠ أزواج كيلوباز) . الدنا عبارة عن حزمة داخل النيكلو كابسيد بشكل القضيب والذى يقترب كثيرا مع غلاف الليبوبروتين وفى النهاية يمتص بمادة بللورية (جسم الامتصاص) مكونا بروتين فردى أو بولى هيدرين أو جرانيولين (28 KDa) والذى يعمل على حماية الفيروسات فى البيئة . (شكل ٤-١) . الباكولوفيروسات تقسم الى ايوباكلوفيرينى تشمل فيروسات البولى هيدروزيس النووية (NPV) والفيروسات المحببة (GV) والتى تمتص جسيمات الفيروسات وكذلك النودوباكولوفيرينى الذى يشمل فيروسات الباكولوفير الماصة . الأخيرة لا تنتج الأجسام الغازية للفيروس ذات الجسيمات الفيروسية العصوية وهى المحمية فقط بغلاف الليبوبروتين .

التركيب الخاص والمتميز لأفراد الايوباكولوفيرينى ينعكس على كيفية تضاعفها فى يرقات الحشرات وخلايا الأفراد . أجسام الامتصاص (البولى هيدرا فى فيروس NPV's والحبيبات فى GV's تهضم بواسطة يرقات الحشرات . فى الوسط عالي القلوية فى المعى الأوسط فان بروتين جسم الامتصاص يذوب وينهار تباعا بواسطة البروتيزيس القلوية فى العائل . يتم تحرير وانفراد جسيمات الفيروس من البولى هيدرا ومن ثم يتغلب على الغشاء المبطن لجدار المعى الأوسط . لذلك فان غشاء الليبوبروتين المحيط بالفيروس يلحم مع غشاء بلازما خلايا جدار الخلية ويفرد أو يطلق النيوكلوكابسيدات فى السيتوبلازم . النيوكلوكابسيدات تنقل "دنا" الفيروس الى نوايا الخلية ومن هنا يبدأ التعبير الجينى للفيروس.

معظم الدراسات عن الحوادث الجزيئية التى تحدث فى تضاعف الباكولوفيروسات أجريت على NPV's وعلى وجه الخصوص فى Autographa californica (Ac) NPV يتم التعبير عن جينات الفيروس فى ثلاثة مراحل متميزة مبكرا ومتأخرا ومتأخرة جدا . فى المرحلة المبكرة ترتبط منتجات جين الفيروسات مع التنشيط الانتقالى لجينات فيروسات أخرى معطية تضاعف فى "دنا" الفيروس . بعد ٦ ساعات من حدوث العدوى يبدأ التعبير الجينى المتأخر ويؤدى الى إنتاج بروتينات ذات تراكيب متفاوتة ترتبط مع تكوين نيوكلوكابسيدات وجسيمات الفيروس النسل . التعبير الجينى المتأخر يصاحب بتراكم انزيم " الرنا المقاوم للألفا – أمانيتين " فى الخلايا المعدية بالفيروس . بعد ١٢ ساعة من العدوى يحدث خروج لنيوكلوكابسيدات نسل الفيروس من الأنوية وتنغرس فى غشاء البلازما للخلايا

المصابة ومن تم تكتسب غلاف الليبوبروتين . جسيمات الفيروس الناضجة هذه تكون معدية وتتجه لغزو خلايا حساسة أخرى داخل العائل الحشرى . يستمر تضاعف الفيروس فى الخلايا الأولية المعدية وتدخل الطور المتأخر جدا" فى التعبير عن جين الفيروس بعد ١٨ ساعة من العدوى . فى هذه المرحلة يتم إنتاج البولى هيدرين والبروتينات P10 للمستويات التى تستطيع أن تصل الى ٣٠-٥٠% من كل محتوى البروتين الكلى لخلايا الفيروس المعدية . بروتين البولى هيدرين الذى يمتص جسيمات النيروس تمسك فى النواة بعد مرحلة التبرعم . يبدو أن البروتين P10 يلعب دور فى عملية تكوين جسم الامتصاص وفى تحلل الخلايا المعدية بالفيروس والتى تساعد فى تحرير وانفراد الفيروس .



شكل (٤-١) : رسم فوتوغرافى دقيق للنقل الالكترونى لبولى هيدرا Ac NPV . لاحظ أجسام الامتصاص البروتينية المحتوية على حزم من النيوكلوكابسيدات فى حزمة مع جسيمات الفيروس . البولى هيدرون حوالى ١ ميكروميتر فى القطر .

تضاعف الباكولوفيروسات الممتصة يمكن أن يعتبر عملية ثنائية المراحل . في المرحلة الأولى جسيمات الفيروس المعدية تتبرعم من الخلية وتنشر العدوى من خلال العائل الحشرى . مع استمرار هذه العملية فان الأجسام الماصة المحتوية على جسيمات الفيروس تتكون فى أنوية الخلايا المصابة . في المراحل الأخيرة من عدوى الحشرة فان العائل يصبح محاطا بأجسام الفيروس الماصة . هذه التركيبات تنفرد وتتحرر من اليرقة عندما ينغلق الجدار . يتم انفراد معلق لبنى من الفيروس مما يلوث أسطح الأوراق النباتية والتى تستهلك بواسطة الحشرات . تضاعف الفيروس فى الباكولوفيروسات يكون معنويا فقط في مرحلة تطور الطور اليرقى . حيث أن اليرقات تمثل معظم الطور المتغذى النشط خلال فترة حياة الحشرة فأنها تكون أكثر الأطوار عرضة للعدوى بالفيروس . الأجسام الماصة لا تستطيع إحداث العدوى من خلال ملامستها لجدار جسم الحشرة . الباكولوفيروسات غير الماصة مثل Oryctes rhinoceros NOV ذات مقدرة على إحداث العدوى في خنافس رينوسيروس. حيث أن معى الخنفساء قريب من التعادل فان الأجسام الماصة لا تذوب . جسيمات الفيروس العارية تنتشر من عائل الى عائل آخر تخرج الفيروس مع المواد الاخراجية . العمليات الخاصة بالتضاعف بين الخلوى للفيروس بعيدا عن غياب المرحلة المتأخرة من التعبير الجينى للفيروس تماثل ما يحدث مع الفيروسات الماصة أو المسدودة .

أمثلة عن الباكولوفيروسات كوسائل فى المكافحة الحيوية للحشرات : توجد العديد من الأمثلة عن استخدام الباكولوفيروسات فى مكافحة الآفات الحشرية . من أنجح الأمثلة استخدام A.gemmatalis فيروس فى البرازيل لمكافحة دودة الفول القطيفية وهى من الآفات الرئيسية فى حقول فول الصويا (Moscardi and Sosa – Gomez ، ١٩٩٢). بعد استقرار كفاءة هذا المستحضر تم رش ما يقارب مليون هكتار من فول الصويا سنويا . هناك نجاح آخر يتمثل فى مكافحة خنفساء أو سوسة النخيل Oryctes rhinocoros فى منطقة الباسفيك بالباكولوفيروس المتجانس غير الماص (Bedford ، ١٩٨١) . لقد حقق استخدام الفيروسات نجاحا مبهرا فى آفات الغابات الحشرية لأن النبات يستطيع تحمل درجة من التلف قبل أن تحدث عدوى الحشرات بالفيروس . فراشة أشجار الصنوبر تكافح بفيروس N.sertifer (NS) NPV . لقد أجريت تجارب لتقييم تجارب الباكولوفيروسات فى مكافحة دودة اللوز الأمريكية فى أمريكا . لقد كانت استخداماتها محدودة بسبب التنافس مع المواد الكيميائية . فى الصين تجرى رش مساحات كبيرة من زراعات القطن بهذا الفيروس (Guangyu ، ١٩٨٩) .

المشاكل التى تجابه استخدام الباكولوفيروسات كوسائل مكافحة حيوية : هناك أمران رئيسيان يحددا تطوير استخدام الباكلوفيروسات كوسائل مكافحة حيوية على المستوى

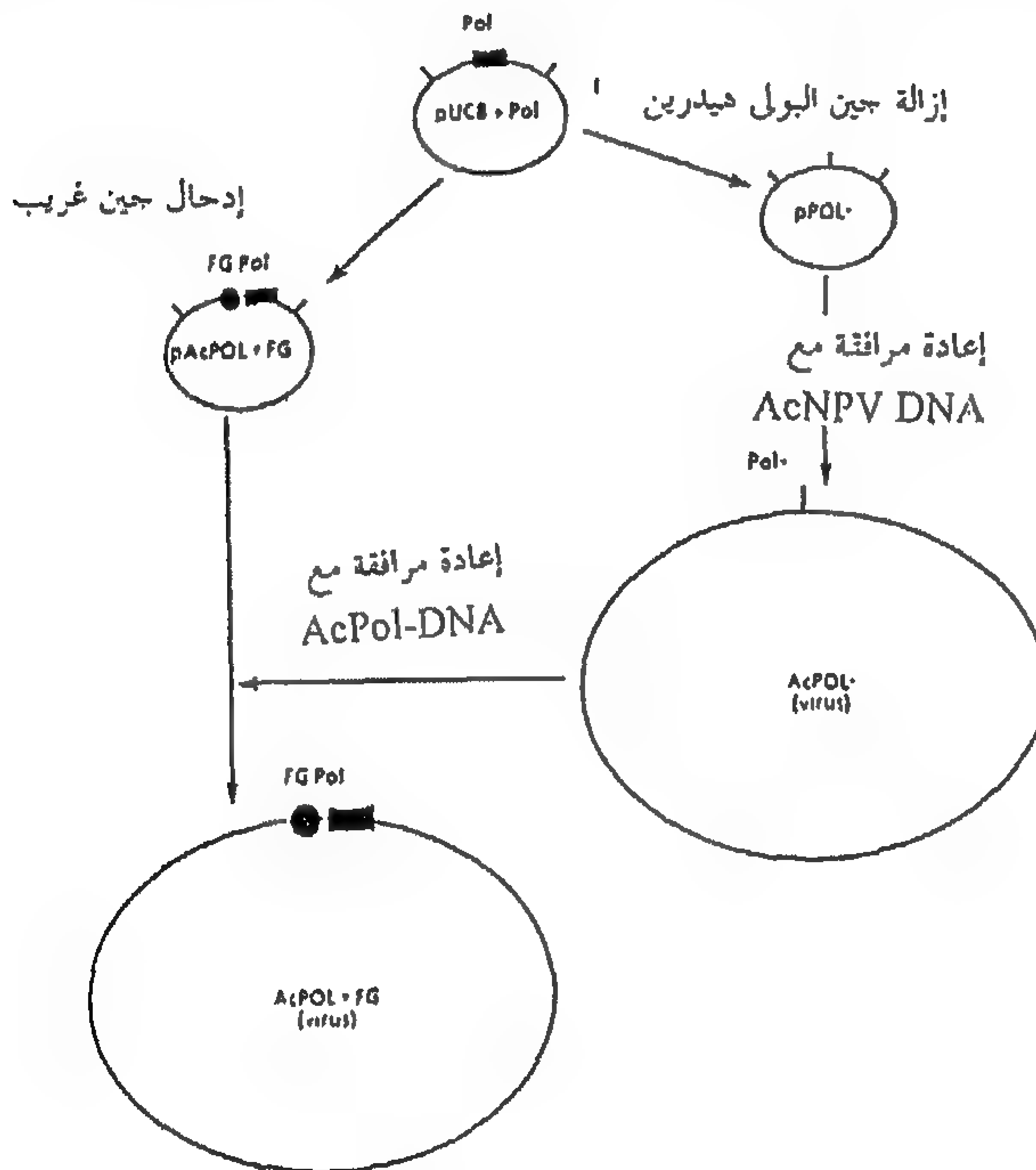
التجارى . الأمر الأول يتعلق بالمدى العوائلى الضيق نسبيا لكل عزلة من عزلات الباكولوفيروس . بالرغم من أن هذا يمثل عامل أمان ممتاز إلا أنه يعنى أنه يجب استخدام مجموعة من منتجات الباكولوفيروسات فى مكافحة الأنواع الحشرية المتعددة كآفات . هذا يزيد من تكاليف الإنتاج لمستويات عالية جدا عما هو الحال مع الوسائل الكيميائية . إن إنتاج المبيدات الحشرية الفيروسية من الباكولوفيروسات يجابه بتعقيدات الحاجة الى استخدام يرقات الحشرات بأعداد كبيرة . إن صيانة وتحقيق تربية حشرات خالية من الفيروس ليست بالأمر السهل كما ان التربية قد تتدهور تحت أية ظروف غر ملائمة . إن استخدام المزارع الخلوية يتزايد على اعتباره بديل عن الحشرات الحية ولكن البيئات الصناعية مكلفة للغاية . هناك اعتبار آخر مؤداه أنه على المدى الطويل فان تضاعف فيروس الباكولوفيروس فى مزرعة الخلايا قد يقلل من الحيوية فى العوائل الطبيعية من اليرقات من خلال تعطيل أو إكساب الدنا الخاص بخلية العائل .

العامل المحدد الثانى والذى يقف فى طريق القبول الواسع للباكولوفيروس يتعلق بالوقت الذى يستغرقه الفيروس لقتل الحشرة المستهدفة بعد العدوى الابتدائية . المواد الكيميائية تتميز بإحداثها للتأثير الصارع السريع للآفة خلال عدة سنوات بينما الباكولوفيروسات يتطلب أيام عديدة لقتل الافة العائل .

الاستراتيجيات لتحسين المبيدات الحشرية من الباكولوفيروسات : الاقتراب الذى قام به معظم المشتغلين بتحسين الكفاءة الابادية لمستحضرات فيروسات الباكولوفيروسات كان يتمثل فى إدخال الجينات التى تشفر وتوجه الهورمونات فى حشرة ما أو الانزيمات أو التوكسينات فى جينوم الفيروس . كانت توقعات البحاث تتمثل فى أن تخليق الجين الغريب فى الحشرة المعدية بالفيروس سوف يقلل من الوقت اللازم لقتل يرقات الحشرة أو على الأقل لتقليل كمية التلف من جراء تغذية اليرقات . استخدام الجينات التى تشفر وتوجه الهورمونات والانزيمات على وجه الخصوص عندما تؤخذ من النوع الحشرى المستهدف تقدم ميزه أن الفيروس سوف ينتج فقط حتى لو كان عند مستوى عالى نفس البروتينات التى تقوم بتخليقها اليرقات العادية خلال مرحلة النمو الطبيعى . فرص أن تصبح الحشرة مقاومة للمنتجات الجينية الخاصة بها تعتبر تحت التحكم ومن ثم لا يكون من السهولة التغلب على عمليات التطور شديدة النظام والتحكم . بالإضافة الى ذلك فان استخدام جينات الحشرة تمثل قليل من المشاكل فى تقييم أمان هذه الفيروسات المندمجة حيث أن الجينات ليست غريبة على الحشرة المستهدفة .

استخدام الجينات التى تشفر التوكسينات ذات جذب كبير للباحثين حيث أن هذه البروتينات تكون ذات تأثير سريع فى صورتها الأصلية وقد تحدث نفس التأثير عندما تنتج

بواسطة الباكولوفيروسات . على العكس فان هناك احتمال مخاطر كبيرة من ان تقوم الحشرة بتطوير المقاومة للتوكسين الغريب . نحن نعتبر أن هذا الخطر قليلا من منطلق أن الحشرة سوف تصبح مقاومة كذلك للتأثيرات الناجمة عن العدوى بالفيروس . فى السنوات الأخيرة تيقن من جدوى التفكير فى إدخال " دنا " غريب فى جينوم الباكولوفيروس . طرق التحوير الوراثى استخدمت كثيرا من فيرولوجى الباكلوفيروسات مثل نظم البروكاريوتيك والايوكاريوتيك . الطرق الذى اشتركت فى تغيير جينوم الباكولوفيروس موضحة فى الشكل (٤-٢) . من الضرورى أن نقول ان هذا الاقتراب يعتمد على وضع نسخة من المنطقة الأجنبية المشفرة تحت سيطرة الاستنساخ المزدوج لبادىء أو محفز من جين الفيروس مثل البولى هيدرين أو P10 .



شكل (٤-٢) : طريقة الحصول على المبيدات الحشرية للبوكولوفيروسات المندمجة . جزء من جينوم الفيروس الذى يمتد مع جين البوليهيدرين يغرس فى ناقل بلازميدى مثل PUC8 . منطقة البوليهيدرين المشفرة تزال من هذه البلازميد لخلق -pPOL . البلازميد ينقل كمرافق معدى فى خلايا الحشرة مع "دنا" الباكولوفيروس المعدى . المناطق المتماثلة فى كل دنا تندمج مسببة احلال جين البوليهيدرين فى الفيروس بالجين ناقص البوليهيدرين من البلازميد لتكوين -AC PUL – "دنا" العدوى من هذا الفيروس ينقل مرافقا مع pAcPOL + FG المحتوى على جين غريب (FG) يغرس فى اتجاه غرس وتلامس جين البوليهيدرين لإنتاج AcPOL + FG .

من المشاكل الخاصة التى تجابه اقتراب التحوير الوراثـى مـع الباكولوفيروسات الحجم الكبير للجينيوم (١٣٣٠٠٠ نيوكلوتيد للفيروس Ac NPV) . من غـير الممكـن إدخال "الدنا" الغريب مباشرة فى موقع الانزيم المقيد بتميز داخل جينوم الفيروس كمـا فـى حالة البلازميدات البكتيرية . لكى نتغلب على هذه المشكلة يتم غرس جـزء مـن جينـوم الباكالوفيروس فى بلازميد بكتيرى كواحد من سلاسل PUC وتحويرها بما يحقـق النظـام الوراثى المطلوب . الشكل (٤-٢) يوضح أن الجزء من جينوم الفيروس الذى يمتد مع جين البوليهيدرين يغرس فى pUC8 ثم يوجه لإنتاج البلازميد مع نسخة مـن منطقـة الجيـن الغريب المشفرة التى تغرس فى اتجاه جين البوليهيدرين . توجد طرق أخرى حيـث يتـم تحوير نفس البلازميد لاستبعاد جين البوليهيدرين . هذا البلازميد (pPOL-) ينقل معديا مـع دنا الفيروس المعدى فى خلايا الحشرات لإحداث العدوى بالفيروس . التجانس بيـن "دنـا" الباكولوفيروس فى pPOL- يؤدى الى الدمج مع نفس التتابعـات فـى جينـوم الفـيروس الملامس . الجين الوظيفى للبوليهيدرين يتم إحلاله بمنطقة قاصرة من جينوم الفيروس مـن pPOL- .

بالرغم من أن ذلك يحدث بتكرارية ٢% فقط فان الطرز الوراثى سالب البوليهيدرين قد ينتخب فى طريقة التقييم الحيوى البسيطة ضد خلفية من المعدن تحتـوى علـى البولـى هيدرا . الفيروسات التى تعانى من نقص جيـن البوليـهيدرين تسـتطيع الاسـتمرار فـى التضاعف بشكل فعال فى خلايا الحشرة . بعد تضاعف وتكبير AcPOL فان "الدنا" من هذا الفيروس يرافق النقل المعدى مع البلازميد المندمـج pAcPOL + FG لإدخـال جيـن البوليهيدرين والجين الغريب بمنطقة المشفرة فى جينوم الباكلوفيروس . مـن الواضـح أن الفيروسات الخالية من البوليهيدرين تحتوى جين أجنبى فى بديل جين البوليهيدرين يمكـن أن تنتج بسهولة كذلك .

الباكولوفيروسات التى تنتج مركبات جينية غريبة كمبيـدات حشـرية : التحكـم والسيطرة على التوازن المائى فى الحشرات يتأثر بفعل الهورمونات المـدرة أو المضـادة لإدرار البول (Maadrell ، ١٩٨٦) . لقد اقترح أن التوازن يحدث لـه خلـل إذا انتـج الباكولوفيروس مستويات عالية من أى الهورمونات هذه فى اليرقات المصابة . هورمـون إدرار البول (DH) تم عزله فى دودة قرون الدخـان Manduce sexta وأمكـن تحديـد التتابع البروتينى (Kataoka وآخرون ، ١٩٨٩) . يتكون الهورمون مـن ٤١ حمـض أمينى بروتينى والتى توجد فى الطرف -C . لقد استخدم هـذا التتـابع الـبروتين لتعميـم والحصول على نيوكلوتيد مخلق مناسب . الببتيد الخارجي يشفر التتابع من ذبابة الفاكهة فى

بروتين الكيوتيكل تم إضافته الى النهاية ´5 للهرومون DH المدر للبول فى المنطقة المشفرة لتسهيل افراز الهورمون من الخلايا المعدية بالفيروس . المنطقة المشفرة للجين المخلق تـم إدخاله فى دودة الحرير أى فى جينوم NPV الفيروس فى مكان المنطقة المشـفرة لجيـن البوليهيدرين تحت سيطرة محفز جين البوليهيدرين وذلك لإنتاج الفيروس سالب البوليهيدرين (Maeda ، ١٩٨٩) . لقد تكاثر الفيروس فى خلايا دودة الحرير فى المزرعة وسلك نفـس السلوك للنوع البرى من الفيروس غير المحور . عندما تحقن يرقة الحشرة بفيروس سـالب البوليهيدرين المندمج لوحظ حدوث نقص فى حجم الهيموليمف خلال جمع العينـات . لقـد قرر الخفض فى حجم الهيموليمف بحوالى ٣٠% بالمقارنة باليرقـات المعديـة الكاذبـة أو اليرقات المعدية بالفيروس البرى . بالإضافة الى ذلك حدث موت لليرقات المعدية بالفيروس المندمج قبل يوم واحد من موت اليرقات المعدية بالفيروس غير المحور . إنتاج هورمونـات إدرار البول فى يرقات الحشرات تأكدت من تحليـل mRNA مـن الحشـرات المعديـة بالفيروس . قياس مستويات إنتاج البروتين فى الحشرات المعدية فى غاية التعقيـد بسـبب صغر حجم الهورمون المتوقع . لقد استخدم عمود متعاكس الوسط لعـزل هورمـون DH الذى تم تحليله فى الحشرات الكاملة حديثة الخروج من حشرة أبو دقيق الكرنب . لـم يتـم الكشف المباشر عن الهورمون باستخدام الطريقة القياسية للفرد الكهربى للبروتينات .

العمليات التى تنظم تطور يرقات الحشرات الى العذارى تعتبر من الأهداف المناسبة للباكولوفيروُسات المندمجة . فى الطور اليرقى الأخير يحدث نقص فى هورمون الحداثـة (JH) والتى تلعب الدور المؤثر في بدايـة التطـور وإنـهاء التغذيـة (de Kort and Granger ، ١٩٨١) . هذا النقص يكون مصحوبا بزيادة واضحة فى مستويات إسـتراز هورمون الحداثة (JHE) . هذا الانزيم (JHE) يحدث تحلل مائى لاستر الميثايل المتحـول الثابت كيميائيا لهورمون الحداثة الـى حـامض الـهورمون JH acid (Hammock ، ١٩٨٥) . تثبيط انزيم إستريز هورمون الحداثة JHE يؤدى الى إنتاج يرقات حشـوات ذات نمو فائق لأن مستوى هورمون (JH) يبقى عاليا بشكل كافى لجعل الحشـرة فـى مرحلـة التغذية (Sparks and Hammock ، ١٩٨٠) . على العكس من ذلك فقد اقترح أنـه إذا تم إنتاج JHE بشكل كافى مبكرا فى مراحل تطور الحشرة فان هورمون الحداثـة سـوف يثبط مما يؤدى الى إبطال التغذية وحدوث تعذر غير كامل (هاموك وآخـرون ، ١٩٩٠) . لقد تم عزل إستريز الهورمون JHE من دودة اللوز الأمريكيـة أو دودة براعـم الدخـان بالتنقية الجدية والدقيقة ثم إجراء التتابع الجزئى (عبد العال وهاموك ، ١٩٨٦ ؛ هـانزليك وآخرون ، ١٩٨٩) . هذه المعلومة تقدم أساس تعميم مجسات النيوكلوتيد المحدود والـذى يستخدم لعزل الكولونات من مجموعة "الدنا" المتكاملة من الحمض النووى mRNA للجسـم

الدهنى . بعد ذلك يغرس الكولون كامل الطول الذى يشفر استريز الـــهورمون JHE فـــى الناقل لفيروس الباكولوفيروس باستخدام محفز البوليهيدرين AcNPV (هاموك وآخـــرون ، ١٩٩٠) . الفيروس المندمج AcRP23 ينتج إستريز هورمون الحداثة JHE فى مزرعـــة خلايا الحشرات وفى حشرة نطاط الكرنب (اليرقات) . عندما يتم تغذية الفيروس فى العمـــر اليرقى الأول من نطاط الكرنب يحدث خفض فى نشاط تغذية اليرقات بالمقارنة باليرقـــات غير المعاملة أو اليرقات التى تغذت على الفيروس الخالى من تتابعـــات JHE المشـــفر . مستويات إستريز الهورمون JHE قيست فى هيموليمف AcRp23 JHE الحشرات المعدية تنسجم مع تلك التى سجلت طبيعيا عند الانسلاخ ولكنها كانت تساوى ١٠% فقط من تلـــك التى قدرت فى الطور اليرقى الأخير . لقد لوحظ نقص التغذية فقط عندمـــا تمـــت تغذيـــة الفيروس المندمج على الطور اليرقى الأول . الأطوار اليرقية لا تظهر نقص فـــى معـــدل الوزن المكتسب . لقد وضع تفسير لهذه الملاحظة بداية فانه فى الأطوار اليرقيـــة الأخـــيرة تكون مستويات JHE الناتجة غير قادرة على التغلب على التخليق الحيـــوى للـــهورمون . كذلك فان إنتاج انزيم الترانسفيريز جلوكوسيل UDP اكديستيرويد من الجيـــن الفيروســـى المشفر قد يقلل من تأثيرات استريز هورمون الحداثة JHE . فـــى النهايـــة فـــان اســـتريز الهورمون JHE غير ثابت بشكل غير عادى فى داخل الكائن عندما ينتج بواسطة الفـــيروس المندمج أو فى صورته الطبيعية .

نقص التأثير على الأطوار اليرقية الأخيرة يبدو أنها تقلل مـــن منظـــور ومســـتقبل الاستخدام الناجح لهذه الانزيمات فى مستحضر مبيد الباكولوفيروسات المندمجة . من غـــير المستحب أن الآفات الحشرية قد تكون مستهدفة بشكل ثابت فى الطور المبكر . من الأمـــور المشجعة أنه يمكن استخدام جين الحشرات لتحوير كفاءة مبيد الباكولوفيروسات . بدون شك فانه تم إحراز تقدم فى زيادة مستويات استريز هورمون الحداثة JHE فى الحشرات المعدية بالفيروس وتحسين ثبات الانزيم فى الداخل . أن إحداث الطفرات فـــى المنطقـــة المشـــفرة لاستريز HHE قد تقدم اقتراب مناسب . الجين ذات الاهتمام الخاص للتعبير عن مستحضر مبيد الباكولوفيروس هو الجاما اندوتوكسين للبكتريا .B.t . الناتج البكتيرى الطبيعى اســـتخدم كمبيد حشرى (Luthy وآخرون ، ١٩٨٢ ، Cxnningham ، ١٩٨٨) وقد قبلت كمنتـــج آمن للاستخدام فى البيئة .

لقد أسفرت دراستان تم فيهما إدخال جينـــات جامـــا – اندوتوكســـين فـــى جينـــوم AcNPV فى بكتريا الباسيلليس (مارتينز وآخرون ، ١٩٩٠) . لقد تم غرس نسخة كاملة الطول من تتابعات الاندوتوكسين المشفرة فى جينوم الباكولوفيروس فى مكان البوليـــهيدرين

جين المشفرة للحصول على فيروسات خالية من البوليهيدرين والتى تنتج الاندوتوكسين . لقد أشار مارتينز وآخرون (١٩٩٠) أن البروتين الناتج فى خلايا الحشرة يكون بللورات كبيرة فى السيتوبلازم . هذه البللورات لها تركيب دقيق مشابه للتوكسين البكتيرى السالب . عندما تغذت يرقة الحشرة على مستخلص الخلية المعدية من الفيروس المندمج حدث نقص فورى فى نشاط التغذية ثم ماتت اليرقات بالتبعية . هذا يحاكى التأثير الطبيعى للاندوتوكسين . لقد قام الباحث Merryweather وآخرون (١٩٩٠) بإنتاج فيروس موجب البوليهيدرين بواسطة غرس التتابعات المشفرة للاندوتوكسين فى اتجاه جين البوليهيدرين تحت سيطرة نسخة من المحفز AcNPV P10 . لقد سهل ذلك من إزالة الاندوتوكسين النشط من تجهيزات الفيروس ومن ثم تسهيل التقييم الحيوى القياسى لتحديد كفاءة الفيروس . عندما أعطيت الحشرة بوليهيدرا منقاة فى التقييم الحيوى لم يحدث تحسن فى كفاءة الفيروس كمبيد حشرى . لقد يرجع هذا الى حقيقة أن التوكسين الأولى كامل الطول قد أنتج فى خلايا الحشرة . هذا قد يتكسر أو يتفكك لإنتاج توكسين نشط بيولوجيا . حيث أن هذه العملية تحدث طبيعيا فى المعى الخاص بيرقات الحشرة فقد أدى الى الاستنتاج أن التوكسين الأولى الذى ينتج بواسطة الفيروس لا يدخل المعى فى نظام العدوى . بالإضافة الى ذلك فان التوكسين المشتق من الباكولوفيروس تم الكشف عنه فقط كبروتين بين خلوى . لكى يتحقق تأثير بيولوجى يجب أن يصدر ويتحرك ويخرج من الخلية . الدراسات المستقبلية سوف تحاول الإجابة على التساؤل عما إذا كانت إضافة إشارة من تتابع الببتيد مناسبة الى التوكسين سوف تسهل من إفراز المنتج المندمج من الخلية . هذا معناه أن الطموحات كبيرة والعلم بلا نهاية .

استخدام التوكسين المتخصص للحشرات مثل الجاما اندوتوكسين لبكتريا .B.t والذى يحدث الفعل فى معى الحشرة المستهدفة يبو أنه يقدم منظور غير مشجع لتحسين كفاءة مستحضرات الباكولوفيروسات فى الوقت الراهن . من الاتجاهات الأكثر مستقبلية التوكسينات العصبية فى الحشرات neurotoxins . لقد تم نشر تقريران حديثا يصفا إنتاج جين التوكسين العصبى للعنكبوت الأحمر (Tomalski and Miller ، ١٩٩١) وجين التوكسين العصبى للعقرب (Stawart وآخرون ، ١٩٩١) بواسطة الباكولوفيروس المندمج فى الحشرات المعدية . توجد بعض الأمثلة التى توضح النشاط البيولوجى للتوكسينات العصبية والتحسين فى كفاءة مستحضر مبيد الحشرات من الباكولوفيروسات . عقرب شمال أفريقيا (الجزائر) A.australis ينتج فينوم أو سم يحتوى على توكسين عصبى متخصص للحشرة (Zlotkin وآخرون ، ١٩٧١) . السم العصبى يؤثر على

توصيل الصوديوم فى جسم الخلية العصبية مما يؤدى الى حدوث تأثير مهيج فى نقط الاتصال العصبى مما يقود الى الشلل والوفاة (Walther وآخرون ، ١٩٧٦) .

النشر الحقلى للباكولوفيروس المحورة وراثيا : لقد أجرى النشر الأول للباكولوفيروس المحور وراثيا فى أوكسفورد بالمملكة المتحدة ، ١٩٨٦ . لقد تم إدخال معلم أو مجس من الأوليجونيوكلوتيد المخلق داخل منطقة غير ضرورية فى جينوم الفيروس AcNPV لإنتاج الفيروس المعلم ورتبا موجب البولى هيدرين . لقد تضمنت بروتوكولات تقويم المخاطر قبل اجراء التجارب الحقلية فحص تأثير التغير على المدى العوائلى وثبات الفيروس . لقد استنتج أن التحور الوراثى لا يسبب أية تغيرات فى الطراز الوراثى للباكولوفيروس . لقد أرسلت نتائج هذه الاختبارات الى جهات التشريع المناسبة وقد حصل البحاث على تصريح باجراء التجارب الحقلية . لقد تم نشر الفيروس AcNPV المعلم الى البيئة عن طريق تغذية البوليهيدرا ليرقات الدودة القارضة ووضعت هذه الحشرات على نباتات بنجر السكر داخل قفص . الحشرات غير المعدية وضعت فى قطعة تجريبية مشابهة للمقارنة . اليرقات المعدية بالفيروس ماتت خلال سبعة أيام . بعد ذلك تم استخراج الفيروس المعلم من التربة فى القفص حتى ميعاد تطهير الموقع بالفورمالين بعد ستة شهور . لقد أظهرت النتائج أنه فى الإمكان نشر الفيروس المحور وراثيا فى البيئة واستكشاف دوام البقاء على مدى ستة شهور فقد النشاط الباقى الفيروسى عند موقع النشر .

هناك أمور يجب أخذها فى الاعتبار حيث انه بمجرد نشر الفيروس المحور وراثيا فى البيئة يجب أن يظل ثابتا الى ما لا نهاية . من الاتجاهات لتفادى هذه المشكلة هو جعل الفيروس فى مستحضر المبيد أقل مقدرة على البقاء فى الحقل بتغيير التكامل التركيبى للجسم الماص الواقى . فى عام ١٩٨٧ أجريت دراسة حقلية ثانية استخدم فيها الباكولوفيروس الخالى من جينالبوليهيدرين . لقد استهدفت الدراسة تقدير ما إذا كان ثبات مستحضر الباكولوفيروس فى البيئة مرتبطا ومحددا بإزالة بروتين البوليهيدرين الواقى من جسيمات الفيروس . تم نشر الفيروس بعد عدوى يرقات دودة ورق القطن الصغرى فى المعمل بالفيروس غير الماص ثم وضعها على نباتات بنجر السكر فى الأقفاص التى استخدمت فى تجارب عام ١٩٨٦ . بعد أسبوع واحد فقط ماتت كل اليرقات . بعد أسبوعين من النشر لم يمكن من تعريف حدوث العدوى بالفيروس على الأسطح النباتية أو غياب التربة . هذا يوضح أن مستحضر الباكولوفيروس يجب أن يحور لتقليل ثباته فى البيئة . لقد أجريت تجارب رائدة فى أعوام ١٩٨٨ ، ١٩٨٩ تم فيها نشر حقلى لفيروس Ac NPV المندمج المحتوىَ على نسخة من .E.c بيتا جالاكتوسيواز (LacZ) فى المنطقة المشفرة تحت سيطرة محفز البوليهيدرين . لقد استهدفت هذه التجارب توضيح أن الفيروس سالب

البوليهيدرين يمكن أن يستخدم لإنتاج منتج الجين الغريب فى يرقات الحشرات فى الحقل . بعد تكرار مرور الفيروس فى المزارع الخلوية والحشرات وجد إأنه يظل ثابتا ويستمر فى إنتاج منتج البيتاجالاكتوسيديز الجينية . لقد تعرض الفيروس لبرنامج التقييم الروتينى للمخاطر قبل السماح بتجربته فى الحقل .

خلاصة القول أن تجارب نشر الفيروس ميدانيا يجب أن تستخدم مستحضرات، المبيدات الحشرية للباكولوفيروس موجب البوليهيدرين . أظهرت تجارب عام ١٩٨٦ التى استخدم فيها Ac NPV حدوث موت لليرقات بسبب العدوى بهذا الفيروس كما ثبت ثبات الفيروس فى الحشرات والتربة وعلى الأسطح النباتية . لم يتم الكشف عن الفيروس خارج نطاق القطع التجريبية ومع نهاية التجربة ثم تنظيف المكان والتخلص من التلوث بالفيروس بالمعاملة بالفورمالين . لذلك تأكد أمان استخدام الصورة الماصة من الفيروس بالرغم من ثبات الفيروس لأن تنظيف المكان من الفيروس المعدى فى نهاية الدراسة كان مؤكدا .

تحليل تقييم مخاطر الباكولوفيروسات المحورة وراثيا : من أكثر النواحى أهمية توضيح ما إذا كانت إضافة "الدنا" الغريبة تؤثر على المدى الطويل لمستحضر الفيروس المندمج والمستخدم كمبيد حشرى . الطرق والخطوات التى يمكن بها التأكد من هذه المعلومة أصبحت متقدمة وميسرة وتتضمن جميع أنواع الحشرات البرية كى تدخل فى تحدى مع الفيروس فى المعمل . إذا أخذ فى الاعتبار أن الفيروسات التى تنتج الآن ذات مواصفات محسنة تظل اختبارات المدى العوائلى فى غاية الأهمية . على سبيل المثال فان النوع الذى كان على حافة الحساسية للفيروس غير المحور قد يقتل بكفاءة أعلى بواسطة الباكولوفيروس المندمج . هذا بالرغم من الدراسات الأولية على الفيروس الذى يحتوى على جين توكسين العقرب لم تثبت هذا القول . لقد ظل المدى العوائلى للفيروس دون تغيير . من المستحب أن يكون ثبات الباكولوفيروس المندمج مماثل لما هو الحال مع الفيروس العادى فى البيئة مؤكدا على أن إدخال تتابعات "الدنا" الغريبة لا تؤثر على تكوين البوليهيدز الناضجة . لذلك فان النتائج من الدراسات الأولية على الفيروس الموجب الماص المهندس وراثيا يمكن أن تستخدم للتنبؤ تتابعات نشر الباكولوفيروس المحتوى على جين غريب . الدمج بين الباكولوفيروسات قد يحدث فى الطبيعة ولكنه يحتمل حدوث ذلك فقط بين الفيروسات القريبة نسبا بعد إحداث العدوى لنفس العائل . السؤال الآن محل الاهتمام عما إذا كان الجين الغريب فى مستحضر مبيد الباكولوفيروس المندمج سيكون ذات مقدرة على الحركة الى فيروس ذات مدى عوائلى مختلف ومن ثم يؤثر على مدى واسع من الأنواع ؟ لم تنجح هذه المحاولات فى التجارب المعملية حيث تأكد أن الخلايا تفضل أن تستقبل "الدنا" الخاص بالفيروس والبلازميد ومازالت المحاولات مستمرة للتغلب على هذه المشكلة .

من أكثر النواحى أهمية فى مجال النشر الميدانى للفيروسات المحورة وراثيا ما يتمثل بتقييم أمان هذه المستحضرات من منطلق ما إذا كان البروتين المندمج الذى ينتج فى الحشرة المعدية بالفيروس سوف تمثل ضرر لأنواع أخرى خاصة الثدييات . هذه هى الحالة خاصة عندما يغرس جين التوكسين فى جينوم الفيروس . من الأهمية التأكيد على أن التوكسين محل التساؤل ذات تخصص عالى على الحشرات . هذا يمكن تأكيده فى تجارب المعمل من خلال حقن أو تغذية أو استنشاق الفيروس بواسطة الثدييات الصغيرة . معيار الجرعة النصفية القاتلة LD50 التى يتحصل عليها من هذه التجارب قد تستخدم لتقدير جرعة التوكسين التى قد تؤثر على الإنسان . أى معلومات تتعلق بإنتاج التوكسين فى الحشرات المعدية بالفيروس قد يمكن من تقدير حمل التوكسين فى البيئة بعد نشر الفيروس المندمج . هذه المعايير مجتمعة تمكن رجال التشريع والبيئة من تحديد ما إذا كان الإنسان والثدييات الأخرى ستتعرض لجرعات ضارة من التوكسين فى البيئة . السؤال الثانى يتمثل فيما إذا كان جين التوكسين الذى غرس فى الباكولوفيروس سوف تحدث له طفرية منتجا مركب أو مركبات ضارة بالثدييات . تحليل قاعدة البيانات الخاصة بتتابع البروتينات لتعريف البروتينات القريبة القرابة تمثل أفضل طريق للتأكد من هذه الفرضية . الحسابات يجب ان تجرى لتقدير عدد التغيرات النيوكليتيدية المطلوبة لإنتاج بروتين نشط يضر بالثدييات . آخذين فى الحسبان أن معدل طفرية "الدنا" لأى نيوكلوتيد ثابتة قد يمكن عمل تقدير دقيق عن إمكانية حدوث هذه التغيرات .

الاستنتاجات والنظرة المستقبلية

وقاية النبات ضد الآفات باستخدام المبيدات مازالت وستظل تمثل الاتجاه الغالب لدى الزراع والعاملين فى مكافحة الآفات بسبب سهولة الإنتاج والتطبيق ومرونة الأداء ورخص التكاليف وغيرها . بالرغم من المشاكل الرهيبة التى حدثت من جراء التوسع فى استخدام المبيدات إلا أن الزراع مازالوا متمسكين بها ولو أن هناك بصيص من الأمل والرجاء فى إدخال وسائل المكافحة الحيوية والتى يجب أن تجهز وتصان فى صورة قادرة على إحداث العدوى . مازالت البحوث والدراسات والتطوير جارية على قدم وساق لإيجاد مستحضرات حيوية تحتوى على البكتريا والفيروسات والفطريات على أمل أن تجد طريقها فى المستقبل القريب فى الأسواق كى تعمل فى تناسق مع المبيدات وليست كبديل كامل لها حيث أنها تؤدى الغرض المنشود منها فى ظل تعداد منخفض من الآفات .

هناك اتجاهان لتحسين كفاءة المستحضرات الحيوية الأول فى التحوير الوراثى بهدف الحصول على طرز وراثية مختلفة من الكائنات الدقيقة والثانى إدخال توكسينات أو هورمونات أو انزيمات متخصصة للحشرات فى جينوم البكتريا أو الفيروسات أو الفطريات

REFERENCES

Abdel-Aal, Y.A.I. and Hammock, B.D. (1986). Transition state analogs as ligands for affinity purification of juvenikle hormone esterase. Science, 233, 1073-6.

Akiba, Y. (1986). Microbial ecology of Bacillus thuringiensis VI. Gemination of Bacillus thruingiensis spores in the soil. Applied Entomology and Zoology, 21, 76-80.

Angus, T.A. (1954). A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. Nature, 173, 545-6.

Beach, R.M. (1990). Application for an experimental use permit to ship and use a pesticide for experimental purposes only. Permit number 58788-EUP-4 for InCideTM 586. Crop Genetics International, Hanover, MD.

Bedford, G.O. (1980). Biology, ecology, and control of plam rhinoceros beetles. Annual Review of Entomology, 25, 309-39.

Bishop, D.H.L., Entwistle, P.F., Cameron, I.R., Allen, C.J. and Possee, R.D. (1988). Field trials of genetically engineered baculovirus insectidcides, in The Release of Genetically Engineered Micro-organisms, (eds M. Sussman, C.H. Collins, F.A. Skinner and D.E., Stewart-Tull), Academic Press, New York, pp. 143-79.

Chamley, A.K. (1984)., Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a speculative review, in Invertebrate-Microbe Interactions, (eds J.M. Anderson, D.M. Rayner and D.W.H. Walton), British Mycological Society Symposium 6, Camnbridge University Press, Cambridge, pp. 229-70.

Coles, R.B. and Pinnock, D.E. (1982). Control fo the pasture cockchafer with the fungal pathogen Metarhizium anisopliae, in Proceedings of the 3rd Australian Conference on Grassland Invertebrate Ecology (ed. K.E. Lee), CSIRO, Australia, pp. 191-98.

Hendrick, K., De Loof, A. and Van Mellaert, H. (1990). Effects of Bacillus thuringiensis isolates effective on resistant Indian meal moth, in Genetics and Biotechnology of the Bacilli, vol. 2, (eds A.T. Ganesan and J.A. Hoc), Academic Press, New York, pp. 233-8.

Honee, G., Vriezen, W. and Visser, B. (1990). A translation fusion product of two different insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis exhibits an enlarged insecticidal spectrum. Applied and Environmental Microbiology, 56, 823-5.

Hussey, N.W. and Tinsley, T.W.)1980). Impressions of insect pathology in the People's Republic of China, in Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980, (ed. H.D. Burges), Academic Press, New York, pp. 513-38.

Ingoffo, Ç.M. (1973). Development of a viral insecticide: Concept to commercialization. Experimental Parasitology, 33, 380-406.

Ishawata, S. (1901). On a kind of severe flacherie (sotto disease). Dainihon Sanshi Kaiho, 114, 1-5.

Jackson, C.W. and Heale, J.B. (1987). Parasexual crosses by hyphal anastomosis and protoplast fusion in the entomopathogen Verticillium lecani. Journal of General Microbiology, 133, 3537-47.

Katoaka, H., Troetschler, R.G., Li, J.P., Kramer, S.J., Camey, R.L., and Schooley, D.A. (1989). Isolation and identification of a diuretic hormone from the tobacco hornworm, Manduca sexta. Proceedings of the National Academy fo Science USA, 86, 2976-80.

Kinsinger, R.A. and McGaughey, W.H. (1979). Susceptibility of populations of Indian meal moth and almond moth to Bacillus thuringiensis. Journal of Economic Entomology, 72, 346-9.

Risco, B.S.H. (1980). Biological control of the leaf froghopper, Mahanarva positicata Stal., with the fungus Metarhizium anisopliae in the state of Alagoas-Brazil. Entomology Newsletter for the Society of Sugarcane Techniques, 9, 10.

Sparks, T.C. and Hammock, B.D. (1980). Comparative inhibition of the juvenile hormone esterases from Trichoplusia ni, Tenebrio monitor, and Musca domestica. Pesticide Biochemistry and Physiology, 14, 290-302.

Suzuki, A., Kawakami, K. and Tamura, S. (1971). Detection of destruxins in silkworm infested with Metarhizium anisopliae. Agricultural and Biological Chemistry. 35, 1641-3.

Teitelbaum, Z., Lazarovici, P. and Zlotkin, E. (1979). Selective binding of the scorpion venom insect toxin to insect nervous tissue. Insect Biochemistry, 9, 343-6.

Whitford, M., Stewart, S., Kuzio, J. and Faulkner, P. (1989). Identificat-ion and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. Journal of Virology, 63, 1393-9.

Zimmermann, G. (1986). Insect pathogenic fungi as pest control agents. Progress in Zoology, 32, 217-31.

Zlotkin, E., Rochat, H., Kopeyan, C. Miranda, F. and Lissitzky, S. (1971). Purification and properties of the insect toxin from the venom of the scorpion Androctonus australis Hector. Biochemie, 53, 1073-7.

الباب الخامس
المحددات الجزيئية لتحقيق المقاومة ضد كيميائيات وقاية المزروعات

مقدمـــــــــة :

الكيميائيات التى تستخدم فى وقاية النباتات تلعب دوراً هاماً فى تحقيق إنتاجية عاليـة من المحاصيل الغذائية ومحاصيل الألياف حيث يشمل فشل هذه الوسائل فى حدوث خسـائر فادحة للمزراع والدخل القومى والأمن الغذائى سواء بسواء . نادراً ما يكون هناك تجـانس فى المادة الحيوية كما يوجد فى الغالب تباينات عريضة فى حساسـية واسـتجابة مجمـوع الحشرات المستهدفة للمبيدات ونفس الشىء مع الممرضات النباتية والحشـائش . طفـرات المقاومة نادرة الحدوث التى تحدث من خلال زيادة مرات الانتخاب مما يجعـل المكافحـة الكيميائية غير فعالة على المدى الطويل . المقاومة ثابتة وذات صفـات وراثيـة كمـا أن مطفرات المقاومة غالبا ما يمكن إيجادها ودراستها فى المعمـل كمـا أن الكشـف المبكـر والدقيق لها فى مجاميع الحشرات فى الحقول ذات اهتمام خاص . تـأثير المقاومـة علـى المزراعين يتمثل فى الفقد فى الإنتاجية وتسويق المحصول . إذا حـدث انتشـار للمقاومـة بسرعة فان تكاليف إنتاج وتطوير المبيد الزراعى لن يمكن تغطيتها من قبـل الصناعـة . الكشف عن وتسويق مبيد جديد يعنى استثمارات طائلة ومن ثم فقد هدف بيوكيميـائى فـى الآفة المستهدفة بسبب المقاومة يعنى اختفاء هذا المركب من الأسواق وعمليـات مكافحـة الآفات وخسارة فادحة لكل الأطراف .

المقاومة ليست ظاهرة جديدة وجميع استراتيجيات استخدام المبيدات طـورت فـى العديد من النظم والتراكيب المحصولية للتغلب عليها بل وتفادى حدوثها . لكى تحقق هـذه الاستراتيجيات أهدافها يجب أن تكون مبنية على معلومات موثوق فيـها حـول النواحـى البيوكيميائية والوراثية والوبائية المتعلقة بالمقاومة . الكثير من هذه الأدلة غير دقيق ومتباينة فى الوقت الراهن وقد تؤدى الى وضع وإدخال استراتيجيات غير مناسبة . فى هذا المقـام سوف نتناول التقدم الذى حدث فى طرق ووسائل البيولوجيا الجزيئية ودورها فـى تحقيـق وتحسين فهم النواحى الأساسية للمقاومة للمبيدات بما يسمح بتعريف دقيق وسريع للمقاومـة ووضع استراتيجيات دائمة ودقيقة عن المقاومة .

الكيميائية الحيوية ووراثية المقاومة

لكى يصل المركب الى الموقع المستهدف يجب أن يمر ويتخطى العديد من الحواجز كل منها يمكن أن يتغير مسببا المقاومة . النفاذية قد تعاق أو تتـأخر (Sawicki ، ١٩٧٣) وفى بعض الحالات قد يؤدى التغيرات فى الغشاء الى إخراج نشط لبعض المبيدات الفطرية مثل الفيناريمول وغيره من مثبطات ١٤-الفا-دى مثيليشن (فقد المثللة) (De waard & Van Nisterooy , DMIS ، ١٩٨٢) . المقاومة لمبيد الحشائش باراكوات فى العديد من أنواع الحشائش ترجع الى نقص الحركة البلاستيكية بسبب عدم حركة الباراكوات بطريقة ما فى خلايا الميزوفيلل (Fuerst وآخرون ، ١٩٨٥) .الحركة البطيئة تطيل التعرض لبطاريات انزيمات التحلل المائى والأكسدة التى تكسر المبيدات ومن ثم تسبب المقاومة . بالرغم من أن فقد السمية نادرا ما يمثل ملمح المقاومة للمبيد الفطرى إلا أنه غالبا ما يمثل التقنية التى تشترك فى المقاومة للمبيد الحشرى ومبيد الحشائش . ليس ذلك بسبب زيادة كمية هذه الانزيمات بشكل كبير فقط حيث أن المبيدات الحشرية الفوسفورية العضوية كمثال تنفصل وتنعزل بواسطة انزيمات الكربوكسيل إستريز قبل أن تصل الى مواقعها المستهدفة ولكن كفاءة التحلل المائى لإنزيمات الهيدرلسييز قد تزداد كذلك (Brown ، ١٩٩٠) . التغيرات الايزوانزيمية تؤدى الى تغيرات فى التخفيض مع زيادة محسوسة فى مستويات السيتوبلازم بى ٤٥٠ مونو أوكسى جينسيز ، فقد سمية مدى واسع من المبيدات الحشرية خلال أكسدة كربون مجاميع الايكيل الاحلالية أو أكسدة رابطة فو – كب للفوسفوروثيوات (Bratstan ، ١٩٩٠) . تحفيز نشاط السيتوكروم بى ٤٥٠ فى المزارع الخلوية للنجيل الأسود (A.myosuroides) يرتبط كذلك بالمقاومة لمبيدات الحشائش من مجموعة اليوريا (Caseley وآخرون ، ١٩٩٠) . تمثيل مبيدات الحشائش مثل الأترازين (Mc Call وأخرون ، ١٩٨٦) والمبيدات الحشرية الفوسفورية (Brattsten ، ١٩٩٠) لتكوين متحولات جلوتاثيون غير سامة تقدم طريق آخر لفقد السمية والمقاومة . يساعد التحول والارتباط بانزيمات جلوتاثيون – اس – ترانسفير والتى تملك تخصص منخفض للوسيط كما أنها قد تعمل ببساطة كبروتينات مرتبطة . كما هو الحال مع انزيمات فقد السمية الأخرى فان الصور الشبيهة للانزيم "isozymas" للجلوتاثيون – اس – ترانسفيريز تسمح بحدوث تغيرات فى تخصصية الوسيط مع المقاومة لكلا المبيدات الحشرية والحشائشية والتى قد تكون مرتبطة بظاهرة المقاومة . هذا الارتباط بين فقد السمية التمثيلى مع المقاومة يفتح مجال للتنشيط والمنشطات التى تثبط انزيمات فقد السمية كى تستخدم فى الاستراتيجيات الخاصة بمجابهة والتغلب وحل مشكلة المقاومة لفعل المبيدات .

التغيرات عند الموقع المستهدف تقدم تقنية أخرى ذات أهمية فى ظهور وتطور المقاومة للمبيد . من الشائع فى المقاومة للمبيد الفطرى حدوث هذا التغير لأن المقاومة المشتركة نادرا ما تمتد الى المبيدات الفطرية بكيفية أو طريقة أخرى للفعل . إن قابلية المبيدات الفطرية ميثيل بنزيميدازول كربامات (Davidse & Flach ، MBC ، ١٩٧٧) ومركب ن – فينيل كربامات (Ishii وآخرون ، ١٩٩٠) الى البروتين المستهدف بيتا – كوبولين تقل فى السلالات المقاومة للعديد من الفطريات بينما تزيد فى الطفرات فائقة الحساسية . فى هذا المثال فان المقاومة لمجموعتى المبيدات الفطرية هذه ترتبط سالبيا وأن زيادة القابلية لمركب ن – فينيل كاربامات تتواكب مع نقص ارتباط المبيدات الفطرية MBC . إن انزيم الأسيتايل كولين استريز مع نقص القابلية للمبيدات الحشرية ميثيل كاربامات تسبب أو تكون مسئولة عن المقاومة فى نطاطات الأوراق الخضراء ولو أن مجاميع ن – الكيل أكبر مازالت مرتبطة بالانزيم وتقتل نطاطات الأوراق (Brown ، ١٩٩٠) . التحور فى البروتين المستهدف D1 للنظام الضوئى II فى البلاستيدات الخضراء مسئولة عن المقاومة لمدى واسع من مبيدات الحشائش التى تثبط البناء الضوئى بما فيها الاترازين .

بالرغم من أن التقنيات البيوكيميائية للمقاومة وصلت الى حد كبير من الفهم فان الأساس الوراثى مازال أقل وضوح بوجه عام . فى الغالب فان العديد من العوامل الوراثية ترتبط بالمقاومة (Crute ، ١٩٩٢) كما تم عزل عدد قليل جدا من الجينات المسئولة عن المقاومة وتأكد من ارتباطها بالتقنيات البيوكيميائية . غالبية الجينات التى وقعت على خرائط تتضمن التغيرات عند الموقع المستهدف والعديد من الالليلات كل منها مسئول عن مستوى مختلف من المقاومة . عندما يكون هناك جين واحد فقط مسئول عن المقاومة تجرى دراسات أخرى للكشف عن التقنيات الجزيئية التى تسبب المقاومة .

طرق كلونة جينات الموقع المستهدف

مبيدات الحشائش

لقد أدت الدراسات المشتركة عن الكيمياء الحيوية والوراثية الى تعريف فعل مبيدات الحشائش من مجموعة السلفونيل يوريا على أنها انزيم أسيتولاكتات سينسيز (ALS) الذى يساعد الخطوة الأولى الشائعة فى التخليق الحيوى للأحماض الأمينية الضرورية ذات السلاسل المتفرعة الفالين والليوسين والأيزوليوسين (Ray ، ١٩٨٤) . نباتات الدخان المقاوم تملك ALS سلفونيل يوريا غير حساس والذى ينفصل وينعزل ترافقيا مع الطرز الوراثى للنبات المقاوم لمبيد الحشائش . السلفونيل يوريا تثبط انزيم ALS فى العديد من

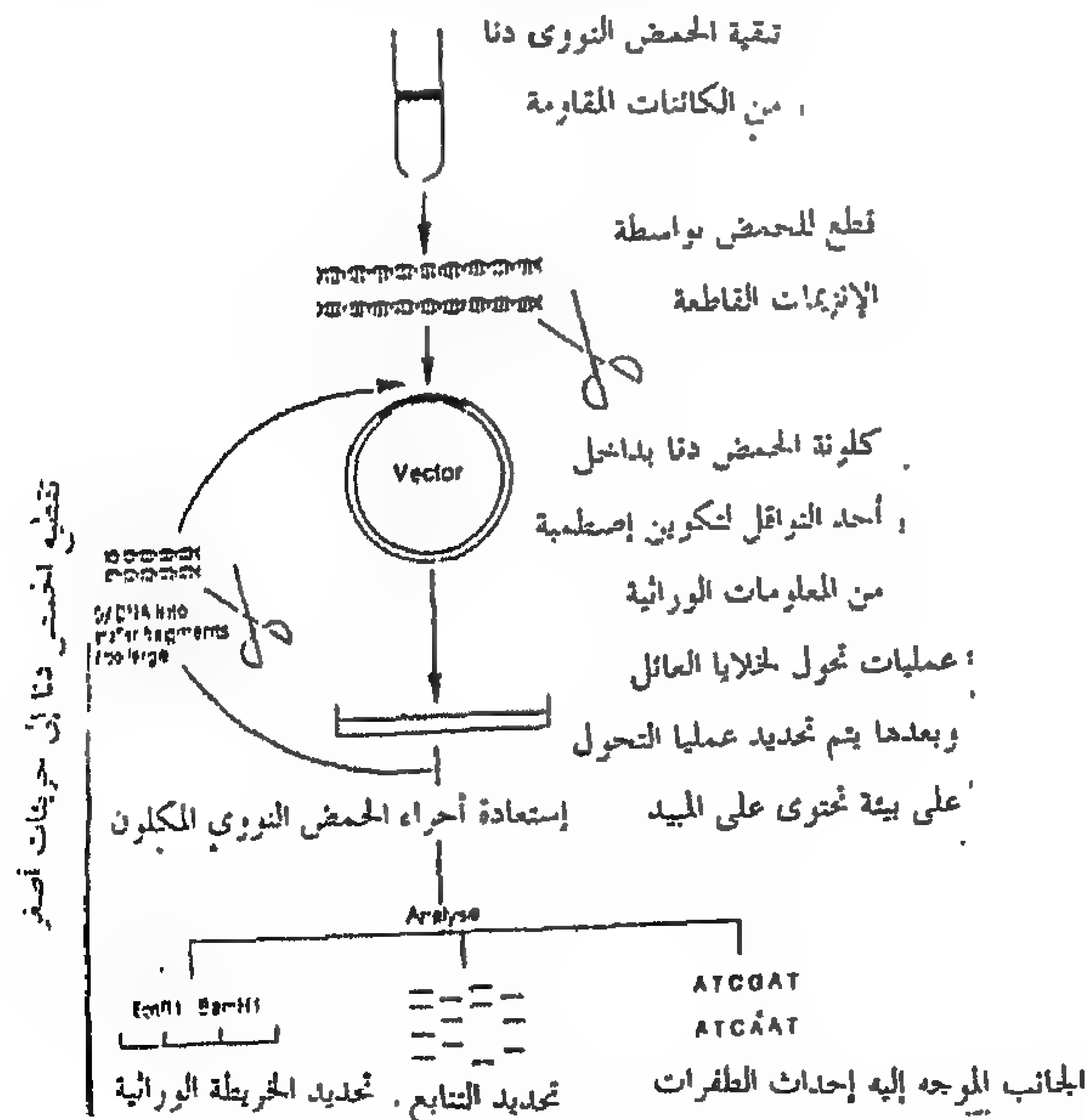
الكائنات الدقيقة بما فيها الخميرة مما أدى الى الاقتراح بأن الانزيم شديد أو عالى الحماية أو الحفاظ . الآن يوجد اقتراب قياسى لكلونة عينات الموقع المستهدف حيث تمت كلونة جين ALS فى الخميرة للحصول على مجس غير متماثل للتفرقة بين بيانات "دنا" الجينوم النباتي. لقد تمت اختبارات التفرقة بين عدد كبير من نسخ بلازميد "دنا" الخميرة فى السلالة البرية من خلال الانتخاب لمقاومة الكلوروسلفيورون المرتبطة مع الإنتاج الزائد من ALS. لقد تم تعريف جين ALS بتحليل الإزالة لكلونات البلازميد الموجبة وتهجينها مع جين ALS مكلون آخر من بكتريا سالمونيلا تيفيموريوم . لقد تم اجراء سلاسل عن إزالة الكلونة وقورنت مع التتابعات الميكروبية ALS المتاحة فى قاعدة المعلومات لتعريف مناطق النيوكلوتيد الحافظة والتى يجب أن تقدم مجسات للتهجين مع تتابعات ALS النباتية . لقد تم اختيار شريحة "الدنا" المحتوية فى الغالب على منطقة كاملة من ALS المشفرة واستخدمت للتفرقة بما هو موجود من الجينوم فاج للـ A.thaliana والدخان . فى هذا المجال تم تعريف العديد من جينات ALS فى العديد من النباتات وتم عزل الفاج منها .

التحليل الكامل لتتابع جينات الدخان و Arabitopsis أظهر بروتينات عالية الحفظ ذات ٨٥% تتابع متماثل على مستوى الحمض الأمينى . القطع والمناطق الجنوبية للدنا الجينومى لهذه النباتات تم جسها بجينات ALS معزولة لتقدير عدد جينات ALS الموجودة فى النوعين . لقد تم هضم شريحتان من "دنا" الدخان بـالاندونيوكلييز المهجنة للمجس وشريحة من Arabidopsis مما أدى الى الاقتراح بأن الدخان من النوع رباعى الصبغية الاليلية allotetraploid به جينان ALS وواحد من الأرابيدوبسيس . هذا يتفق مع تحليل المقاومة للسلفونيل يوريا فى الدخان الذى يسيطر عليه من خلال جينان متميزان . تحليل سوثرن "لدنا" الذرة وفول الصويا أوضح وجود جينات ALS متعددة .

لقد تم تجميع كل البيانات الخاصة "بالدنا" الجينومى من خطين من خطوط الدخان المقاومة للسلفونيل يوريا . واحد تم تطفيره عند الموقع SuRA أظهر مقاومة ١٠٠ مرة للكلوروسلفيدرون عما هو الحال مع الأب العادى البرى أما الثانى أظهر مقاومة ١٠٠٠ مرة وتم تطفيره عن الموقع الثانى SuRB . أظهر التحليل الكامل للتتابع للجينات تماثل الطفرية الموضعية المسئولة عن المقاومة لمبيد الحشائش . فى الخط الأول SuRA حدث طفرة من C الى A للجلوتامين الاحلالى للبرولين عند موضع ١٩١ للحمض الأمينى . فى الخط الثانى SuRB حدث تغير من C الى G للالانين الاحلالى للبرولين عند نفس موضع الحمض الأمينى بينما حدثت الطفرة الثانية من G الى T لليوسين الاحلالى للتربتوفان عند موضع الحمض الأمينى ٥٦٨ . لم يتأثر نشاط ALS لهاتين الطفرتين الخاصة بالمقاومة

مما يوضح أن التغيرات لموقع التحليل فى الانزيم لا تشترك فى العمليـــة بشـــكل قـــاطع . بالرغم من أن موقعان فقط فى مناطق الحفظ لجين ALS يرتبطا بالمقاومة فى النباتـــات إلا أنه فى الخميرة اتضح أن الاحلالات على عشرة مواقع منفصلة فى البروتين وجدت مرتبطة بالمقاومة للسلفونيل يوريا (Hartnett وأخرون ، ١٩٩٠) .

هذا المثال الذى يستعرض أبعاد وأدوار ALS يقدم اتجاهات عديدة للاســـتراتيجيات شائعة الاستخدام لعزل جينات الموقع المستهدف وفهم الأساس الجزيئى للمقاومة (الشـــكل ٥-١) . التأكيد على وظيفة الجين غالبا ترتكز على مقارنات التتابع للجينـــات المعروفـــة والموجودة فعلا فى قاعدة المعلومات . لقد اســـتخدمت مجســـات غـــير متماثلـــة لجينـــات B.tubulin من المصادر الأخرى بشكل متكرر لكلونة نفس الجين من العديد من الفطريات المختلفة (May وآخرون ، ١٩٨٧) . لقد اتبع نفس الاتجاه لكلونة بروتيـــن D1 لمركـــز تفاعل النظام الضوئى II وتعريف العديد من الطفرات الموضعية السائدة بين الفـــالين ٢١٧ والليوسين ٢٧٥ المسئولة عن المقاومة لمدى من مبيدات الحشائش التى تثبط عمليات البنـــاء الضوئى (Trebst ، ١٩٩١) . لقد استخدمت المجسات المتماثلة لكلونـــة جينـــات قنـــاة الصوديوم لسلالات الدروسوفيلا الحساسة والمقاومة للبيرثريودز . . لقـــد أظـــهر التتـــابع الجزئى أن تغيير واحد فى قاعدة "الدنا" لإحلال الاسبارجين الى حمض الأســـبارتيك عنـــد الحمض الأمينى ١١٧٢ ترتبط بظاهرة الصرع Knock-down (Kdo) كعـــامل مقاومـــة (Pauron وآخرون ، ١٩٩٢)



شكل (٥-١) : الاستراتيجية العامة لكلونة الجينات المقاومة للمبيد

المبيدات الفطرية

انتخاب مكنونات البلازميد المجهزة من السلالات المقاومة للمبيد الفطرى قد استخدم بشيوع كبير بكلونة جينات الموقع المستهدف خاصة عندما تظهر الليلات المقاومة سيادة ويمكن تعريفها فى النظام الجنيومى للسلالة العادية البرية . لقد تم كلونة وتتابع العديد من الليلات البيتا – توبولين فى العديد من السلالات المقاومة MBC عن هذا الطريق . فى الوقت الراهن وحديثا الانتخاب للمقاومة للكاربوكسين استخدم لعزل جين Cbx من الفطر Ustilago meydis الذى يشفر لجزئية الحديد – الكبريت فى معقد الميتوكوندريا II (Keon وآخرون ، ١٩٩٢) . فى هذه الحالة فان احلال الهيستيدين بالليوسين فى الحديد الثالث – عنقود الكبريت للبروتين يرتبط بالمقاومة . لقد تحصل ذلك من خلال التغيرات فى زوجان من القواعد المتجاورة مما يغير من كود الحمض الأمينى ٧٥٢ مما أدى الى الاقتراح بأنه ربما يكون الالليل Cbx عبارة عن مطفر مزدوج . جين الاستيرول ١٤– الفا – ديمثيليز من الخميرة تعتبر الموقع المستهدف للترايازول وغيرها من المبيدات الفطرية وقد كلون لتفرقة مكنون الجينيوم فى ناقل متعدد النسخ للبلازميد والانتخاب للمقاومة لمركب الكيتوكونازول والتعبير الفائق عن السيتوكروم بى – ٤٥٠ (Kalb وآخرون ، ١٩٨٧) .

كلونة جينات الموقع المستهدف وتعريف التغيرات الفردية فى قاعدة "الدنا" التى تسبب المقاومة ليس بدون تجاوزات أو عيوب . الجينات غير المرتبطة بالموقع المستهدف ولكنها تشفر لتحقيق المقاومة للمبيدات قد تتساوى فى الكلونة . تتابعات "الدنا" لا تمر بدون أخطاء حيث أن مشروع الجينوم البشرى على سبيل المثال يبنى على أساس توقع أن ١ : ٤٠٠ من أزواج قواعد النيوكلوتيد سوف تحدث بشكل خاطىء . بالرغم من ان قواعد المعلومات تتزايد فى الحجم فأنها مثقلة دون معنى وقد لا تقدم تتابعات متوافقة لتعريف وظيفة ممكنة لكلونة شريحة "الدنا" . عندما توجد عائلات كثيرة للجينات كما فى السيتوكروم بى ٤٥٠ وجينات البيتا – توبولين والعديد من الأيزوانزيمات قد توجد فى نفس النسيج كما أن التتابع المتجانس قد يسمح للجينات بالكلونة والتى لا ترتبط بفعل المبيد . على سبيل المثال فان الليل ben A لجين البيتاتوبولين لفطر اسبرجيلليس نيديولانس مسئول عن المقاومة للمبيدات الفطرية MBC حتى فى نظم النقل غير المتجانسة بينما الجين الثانى للبيتا – توبولين tub C غير مسئول كالأول . على الأقل فان تسعة جينات بيتا – توبولين يعبر عنها فى الـ "Arabidopsis" (Snustad وآخرون ، ١٩٩٢) . لكى نستطيع تحقيق الاستفادة من التكنولوجيا الجزيئية والفهم الكامل لتقنيات المقاومة يجب ان تعبر الجينات المكونة عن نفسها بوضوح لتأكيد وظيفتها .

الخميرة تقدم نظام جيد للتعبير حيث أن أى "دنا" دخيل والذى يستطيع أن يحدث خلل من إدخال جين آخر فى شريحة "الدنا" المكلونة فأنها تندمج بوجه عام مع التتابعات المتماثلة الموجودة . تحويل الخميرة ثنائية الصبغية مع تركيبات مناسبة فانه يمكن استرجاع طفـرات كنسل وحيد الصبغة وتحديد أى ضرر بيوكيميائى . الحفاظ على نشاط النوع الأصلى البرى من خلال التكامل مع الجين المكلون غير المتماثل تسمح بوظيفته وهذا يستوجب التـأكيد . لسوء الحظ فان الخميرة التى تعانى من نقص آلية الانزيم الضرورية لإحداث التتـابع إلا إذا كانت كولونات c DNA متاحة وشرائح "الدنا" المحتوية على الانترون لا يستحب التعبـير عنها . بالرغم من أن الناقلات متاحة وهى تستخدم لخلق طفرات فى القليل من الفطريـات الأخرى مثل يوسيتيلاجو فى معظم تحولات الفطريات الخيطية تؤدى الى غـرس "الدنـا" الوافد عند موضع عشوائى يشترك فى تتابعات غـير مرتبطـة بـالموضوع . الطفـرات المستهدفة يمكن إنتاجها فى الفطريات الخيطية مثل نيوروسبورا كراسا باسـتخدام ظـاهرة تكرار تحفيز الطفرة الموضعية المتكررة (RIP ، سيلكو ، ١٩٩٠) . من خـلال المثللـة المكثفة للسيتوسين للدنا المتماثل المقدم وطفرات A-T . بمجرد تواجد السلالات المناسـبة يمكن استخدام طفرية الموقع المباشرة لتأكيد جزيئية المقاومة .

تفاعل سلسلة البوليميزيز (PCR) والمقاومة للمبيدات

طرق وتكنيكات تفاعل سلسلة البوليميريز (PCR) تبسـط بشـكل كبـير تحليـل الاختلافات الوراثية والطفرية المرتبطة بالمقاومة للمبيدات (التفاصيل ذكرت فـى البـاب الأول) . وفرة التتابع المكبر المستهدف يقلل بدرجة كبيرة مـن حـدود التقديـر ويسـمح بالاستخدام العملى لنظم الكشف غير النظائر المشعة . لقد استخدمت تقنيات PCR لتحليـل التغيرات الطفرية المرتبطة بالمقاومة لمركبات MBC فى فطر R.secalis الـذى يسـبب تبقع أوراق الشعير . لقد أوضحت الدراسات على العديـد مـن الفطريـات أن إحـلالات الأحماض الأمينية التى تشترك فى المقاومة لمركبات MBC يمكن أن تحدث مـن خـلال جين البيتا – توبولين (جدول ٥ – ١) . هذا بالرغم من أن الطفرات التـى تؤثـر علـى الأحماض الأمينية فى المواضع ١٩٨ ، ٢٠٠ تبدو هامة فى الفطريات الخيطية الممرضـة للنباتات .

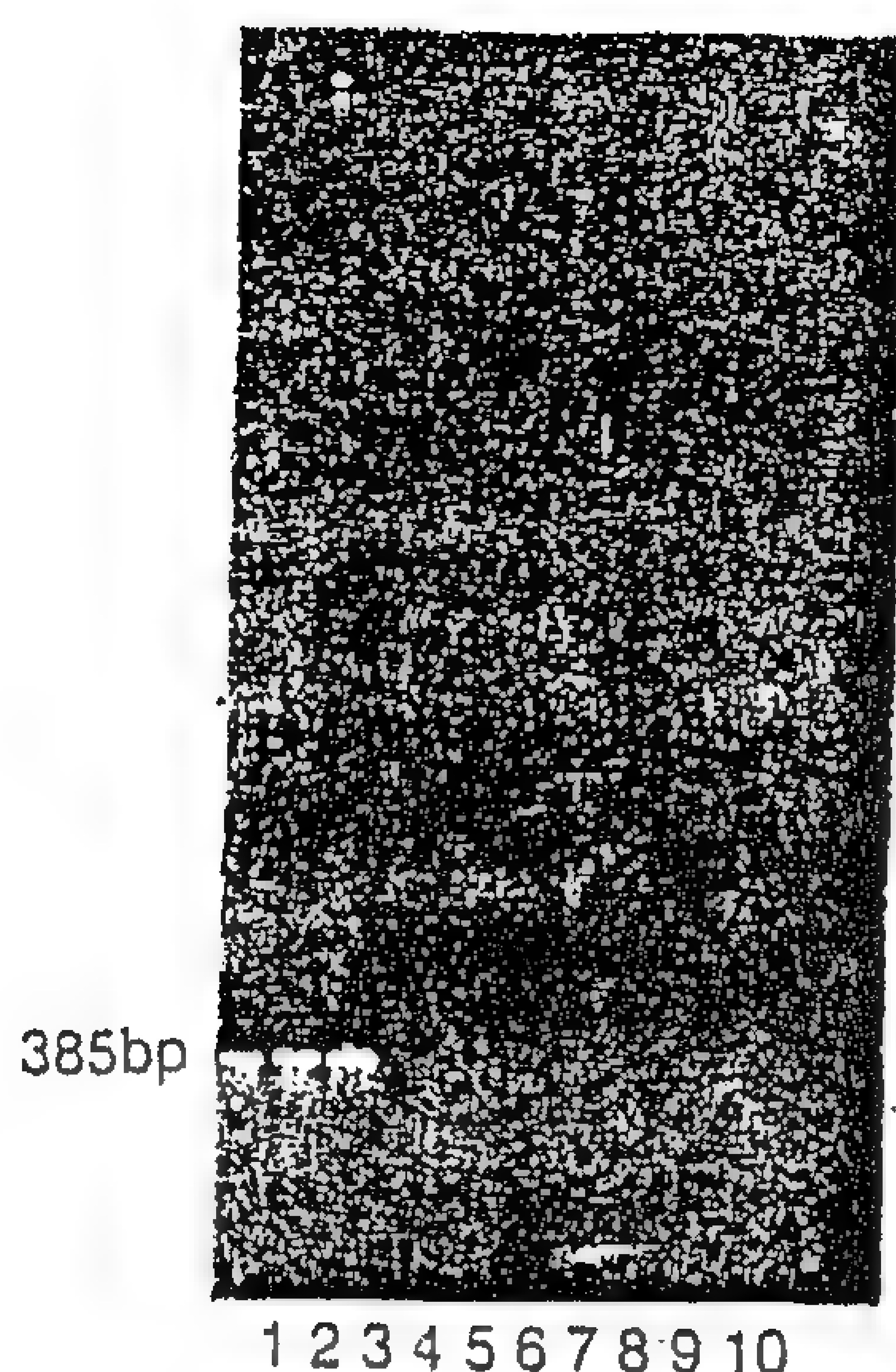
جدول (٥-١) : احلالات الحمض الأمينى فى جينات البيتاتوبولين المسئولة عن المقاومـــة لمركب MBC

الكائن Organism	حمض أمينى Amino acid Substitution		Position	المرجع Reference المرجع
Laboratory mutants	الطفرات المعملية			
A.nidulans				
	His ›	Tyr	6	Osmani and Oakley (1991)
	His ›	Leu	6	Osmani and Oakley (1991)
	Tyr ›	Asn	50	Koenraadt et al. (1992)
	Tyr ›	Ser	50	Koenraadt et al. (1992)
	Gln ›	Lys	134	Koenraadt et al. (1992)
	Ala ›	Val	165	Osmani and Oakley (1991)
	Glu ›	Asp	198	Osmani and Oakley (1991)
	Glu ›	Glu	198	Osmani and Oakley (1991)
	Gln ›	Lys	198	Osmani and Oakley (1991)
	Phe ›	Tyr	200	Osmani and Oakley (1991)
	Met ›	Leu	257	Koenraadt et al. (1992)
N.crassa	Phe ›	Tyr	167	Orbach et al. (1986)
	Glu ›	Glu	198	Fujimura et al. (1990)
R.secalis	Gln ›	Lys	198	Hollomon and Butters (1992)
S.cereoisiae	Arg ›	His	241	Thomas et al. (1985)
S.nodorum	His ›	Tyr	6	Cooley and Caten (1993)
Fieldisolates	الطفرات الحقلية			
B.cinerea	Glu ›	Ala	198	Martin et al. (1992)
R.secalis	Glu ›	Glu	198	Hollomon and Butters (1992)
S.homoeocarpa	Gln ›	Lys	200	Koenraadt et al. (1992)
V.inaequalis	Glu ›	Ala	198	Koenraadt et al. (1992)
	Glu ›	Glu	198	Koenraadt et al. (1992)
	Gln ›	Lys	198	Koenraadt et al. (1992)
	Phe ›	Tyr	200	Koenraadt et al. (1992)
V.pirina	Glu ›	Ala	198	Koenraadt et al. (1992)
	Phe ›	Tyr	200	Koenraadt et al. (1992)
M.fructicola	Gln ›	Lys	198	Koenraadt et al. (1992)
Penicillium spp.	Gln ›	Lys	198	Koenraadt et al. (1992)
	Glu ›	Ala	198	Koenraadt et al. (1992)
	Glu ›	Val	198	Koenraadt et al. (1992)
	Phe ›	Tyr	198	Koenraadt et al. (1992)

فى الاتجاه العلوى للوضع (5) من هذين الحمضين الأمينين توجد تتابعات عديدة للنيوكليتيدات المصونة فى جينات البيتا – توبولين والتى تستغل كبادئات محدودة النيوكلوتيد للـ PCR أما فى الموضع التحتى (3) يكون التتابع المتجانس كثير المحدودية . الجدول (٥-٢) يوضح المناطق المصونة لتسعة جينات بيتاتوبولين الفطرية والتتابع العقلانى الذى استخدم لتخليق البادئات الكاملة التخليق مع النسبة GC : AT حول الواحد الصحيح . هذين البادئين استخدما لتكبير شريحة 520 bp من "دنا" الجينوم الخاص R.secalis المشفر للأحماض الأمينية الـ ١٧٣ . التتابع المباشر لنواتج PCR تسمح بتعريف موقعان أوليان داخليان واللذان لا يستكملان فقط بشكل كلى لتتابع البيتاتوبولين الجينومى للفطر R.secalis ولكنهما قد يستخدما كبادئات لتقليل احتمالات تكبير "الدنا" غير المستهدف (الشكل ٥-٢) .

جدول (٥-٢) : أمثلة عن المناطق المصونة فى تسعة جينات للبيتاتوبولين لتصميم بادئات انحلال PCR "degenerate PCR primers"

Organism الكائن	Amino acid 134 … 141 Q I T H S L G G
Epichloe typhina	CAGATCACCCACTCTCTTGTGGTGG...
Neurospora crassa	CAGATCACCCACTCCCTCGGTGGTGG ...
Schizosaccharomyces pombe	CAATTAACTCACTCTTTGGGTGGTGG ...
Erysiphe graminis	CAAATAACACATTCTCTTGGGGTGG ...
Candida albicans	CAAATCACCCATTCTTCTTTGGGTGGTGG...
Aspergillus nidulans	CAGATCACCCACTCTCTCGGTGGTGG ...
Aspergillus flauus	CAGATTACCCACTCCCTCGGTGGTGG ...
Colletotrichum graminicola	CAGATTACCCACTCCCTCGGTGGAGG ...
Saccharomyces cereuisiae	CAGATCACACATTCTCTTGGTGGTGG ...
Degenerate primer 5	CAAATCACCCACTCCCTCGGGTGGTGG 3 G T T T T
	Amino acid 300 … 306 M A A S D F R
Epichloe typhina	...TGATGGCTGCTTCTGATTTCAGAAA
Neurospora crassa	...TGATGGCTGCTTCTGACTTCCGCAA
Schizosaccharomyces pombe	...TGATGGTCGCCGCTGATCCTCGCCA
Erysiphe graminis	...TGATGGCAGCATCCGACTTCCGAAA
Candida albicans	...TGATGGCTGCTCTGATCCAAGAAA
Aspergillus nidulans	...TGATGGCTGCCTCTGACTTCCGCAA
Aspergillus flauus	...TGATGGCTGCTTCTGACTTCCGTAA
Colletotrichum graminicola	...TGATGGCTGCCTCTGACTTCCGCAA
Saccharomyces cereuisiae	...TGATGGCTGCTGCCGATCCAAGAAA
Degenerate primer (reverse)3	ACTACCGACGGAGACTGAAGGCTTT 5



شكل (٥-٢) : تكبير PCR لشريحة البنتا – توبولين من الدنا الجينومى للفطر R.secalis . لقد استخدم الدنا الجينومى المنقى فى الفينول – كلوروفوزم كصفيحة أو شريحة فى تفاعل PCR (١٠٠ ميكروليتر) لثلاثون دورة تحت الظروف القياسية الآتية :

Annealing 65oC/1 min ; primer extension 72 : C/2 min ; denaturation 94o C/1 min . Then 20 ul of each reaction was separated on a 3.0% Nusieve agarose gel (containing ethidium bromide) at 4.7 v/cm. Lanes 1-3 ; complete reaction mixture : lanes 4 and 5 ; no template DNA ; lanes 6 and 7 ; no Taq poly merase ; lane 8 : No (Mg^{2+}) ; lanes 9 and 10 ; no primers .

الطرق الخاصة بتفاعلات سلسلة البوليميريز (PCR) تسمح بتراكم سريع لكم كبير من بيانات التتابع لسلالات عديدة من فطر R.secalis التى تختلف فى حساسيتها للمبيدات الفطرية MBC . هذه توضح فقط التغيرات على موضع الحمض الأمينى ١٩٨ مع احلال حامض الجلوتاميك في النوع العادى بالجلايسين أو اللايسين (جدول ٥-٣) . هذه الاحلالات جميعا نتيجة للتغيرات فى قاعدة واحدة للحمض النووى "دنا" . لقد تأكدت احلالات اضافية للحمض الأمينى عند الموقع ١٩٨ من خلال نفس طريقة التحليل PCR فى السلالات المقاومة لمركب MBC فى فطريات فينتوريا ايناكواليس ، مونيلينيا فراكتيكولا والعديد من أنواع البنسيليوم وكذلك تغيير الفينيل الانية بالتيروسين عند موضع الحمض الأمينى ٢٠٠ (Koanraadt ، وأخرون ، ١٩٩٢) .

جدول (٥-٣) : تغيرات "الدنا" والمقاومة لمركبات MBC فى الفطر R.Secalis

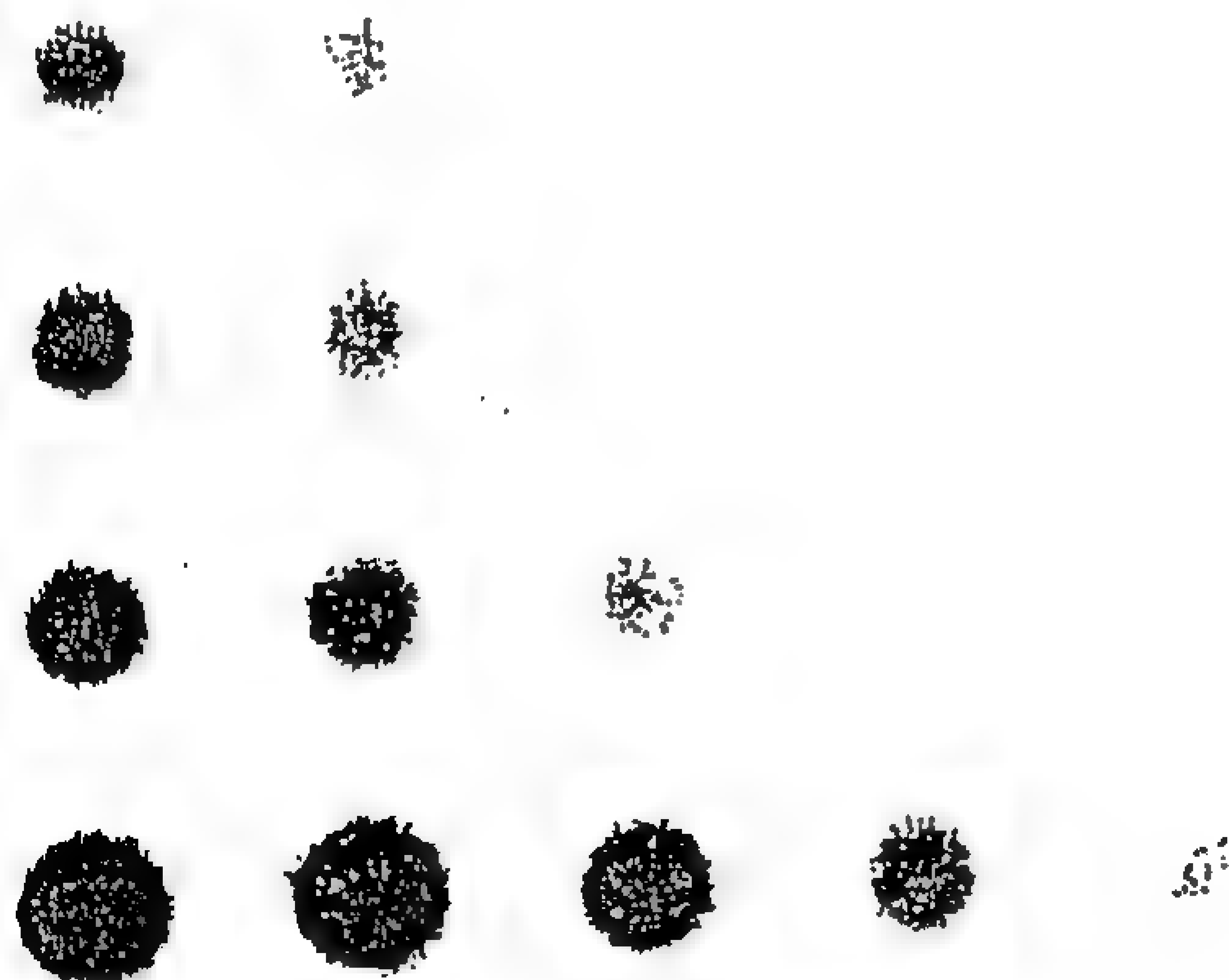
	Amino acids						Fungicide sensitiuity
	196	197	198	199	200	201	
Isolate	(Ser)	(Asp)	(Glu)	(Thr)	(Phe)	(Cys)	(MBC)
K1124	TCT	GAT	GAG	ACC	TTC	TGT	S
554	TCT	GAT	GAG	ACC	TTC	TGT	S
666.02	TCT	GAT	Gly GGG	ACC	TTC	TGT	R
Ben 22.	TCT	GAT	Lys AAG	ACC	TTC	TGT	R

تكبير أو تضخيم الجين والمقاومة Gene amplification

فى العديد من المجاميع الطبيعية فان المقاومة للأدوية والمبيدات وغيرها من الكيميائيات السامة تزداد فى الغالب بنظام هندسى متدرج ومن ثم تصبح غير ثابتة وتعود الى حالة الحساسية عندما يحدث ارتخاء فى الانتخاب . الدراسات على الكائنات الدقيقة تربط هذه التغيرات مع تكبير الجين وزيادة مستويات البروتين المستهدف أو الانزيمات المسئولة عن فقد السمية والتى قد تصل الى ١٠% من البروتين الخلوى الكلى . لقد لوحظ نفس النظام من التطور فى المقاومة لمدى عريض من المبيدات الحشرية بواسطة من الخوخ والبطاطس (Myzus yersicae) وقد ارتبطت ذلك بزيادة تدريجية فى مستويات الاستيريزات E4 and FE4 وكلاهما تحدث تحلل مائى وتفكك فى استرات المبيدات الحشرية (Eevonshire and Sawicki ، ١٩٧٩) . العديد من الطرق الجزيئية الجيدة استخدمت لتأكيد فرضية التكبير واستبعاد إمكانية أن انتخاب الجينات غير المسئولة أو غير المرتبطة (المستقلة) مع تأثيرات إضافية خالصة والتى قد تكون مسئولة عن تطور المقاومة للمبيدات الحشرية فى المن .

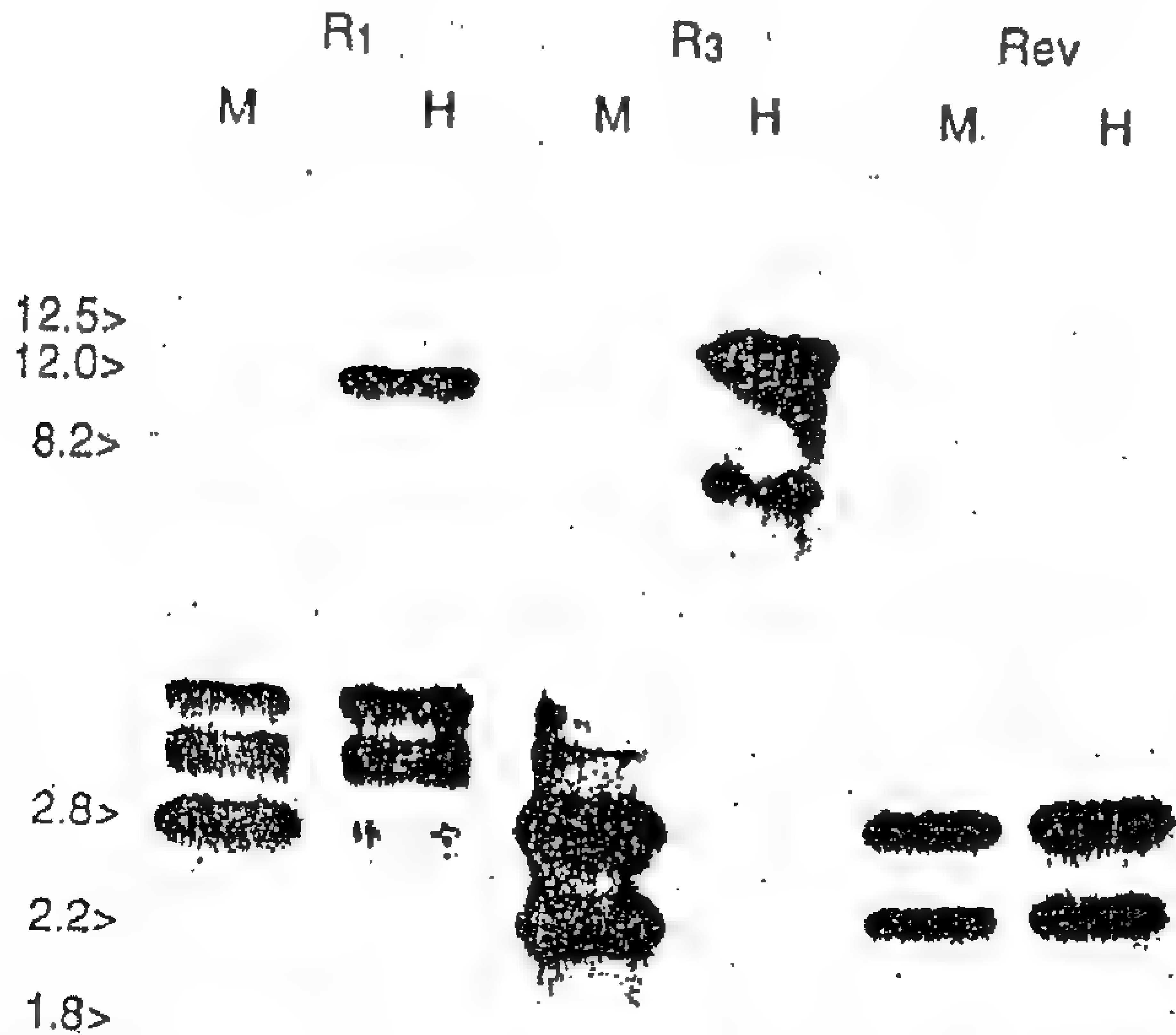
بروتين E4 تم تنقيته من كلون المن المقاوم واستخدم لاحداث المناعة فى الأرانب بحيث تنتج مصل أجسام مضادة عديدة الكلونة antisesa لاستريز E4 . لقد تم تعريف أجزاء A RNA المتعدد (mRNA) الغنية بالحمض والبروتين E4 mRNA فى خلية الأرانب الحرة الخالية من نظام تخليق بروتين الخلايا الشبكية بواسطة ترسيب متخصص

للمناعة مع الأجسام المضادة E4 . النسخ المعاكس ينتج نسخ من "الدنا" مزدوجة الشـرائط (c DNA) من أجزاء mRNA وهذه تكلون فى ناقل البلازميد . لتعريف الكولونات التـى تحتوى على الأقل على جزء من منطقة E4 المشفرة وهؤلاء الذين يحدث لهم تهجين قـوى الى مكون E4mRNA عوملت بانزيم R?NA-ase H والتى تحطم الهجن DNA-RNA وليس تتابعات الحمض النووي منفرد الشريط . كولونات cDNA تتكامل مع E4 mRNA توقف تخليق استريز E4 توقف تخليق استريز E4 فى نظام تخليق بروتين خلايا الشـبكة . مجسات cDNA المتخصصة E4 التى عزلت عن هذا الطريق تم تهجينها بطريقة التحليـل dot-blot للحمض DNA الكلى والفصل من السلالة الحساسة , R2(X16) , R3 (X64) (S) , R1(X4) فى كلونات المن . كثافة اشارة المجس زادت فى الخط مع المقاومة ممـا يوضح أن مستويات استريز E4 وعدد نسخ الجين مرتبطة (الشكل ٥-٣) . بقع سـاوثرن للدنا DNA المهضوم لبكتريا ECORI أوضحت أن جينات E4 المبكرة توجد على شريحة 8kb بينما الجين FE4 الذى يشفر لاستريز أكبر قليلا يرتبط مع مستويات منخفضـة مـن المقاومة (R1) يقع على شريحة 4kb (Field and Devonshire ، ١٩٩٢) . كلونـة وتتابع هذه الشرائح الجينومية اقترحت أن الجينات لها منطقة 5' مشفرة تمتد للموقع النشـط للانزيم ولكن الجين E4 يكون أصغر ربما نتيجة لإعادة الترتيب المتسبب عن الانتقال .



شكل (٥-٣) : ارتباط E4 استريز cDNA للدنا الجينومى المستخلص من كلولونات السلالة الحساسـة وثلاثة سلالات مقاومة من من الخوخ . البطش المنطقة لدنا المن المعزول (٨ ، ٤ ، ٢ ، ١٠ ، ٠,٥ ، ٠,٢٥ ميكروجرام) ارتفعت حتى ٨ ميكروجرام مع دنا سيرم الرنكة عنـد الضرورة .

حيث أن كولونات المن عالية المقاومة تستطيع أن تفقد مقاومتها ومستويات الاستريزيات المرتفعة فى الحال يكون من المثير للاهتمام فهم التقنيات الجزيئية التى تنظم التكبير . لقد وجد أن من الصوب الحساس تحتوى على كولونات على مستويات عادية من E4 mRNA ولكن جين E4 المكبر يظل موجودا علي شريحة BkbECORI دون وجود أى إعادة ترتيب واضح . لقد اتضح وجود اختلاف واضح بين تتابعات الاستريز E4 الصامتة والمعبر عنها بواسطة قيود هضم الدنا الجينومى باستخدام الأيزوشيزوميرات HpaII , MsPI وكلاهما يكسر تتابعات CCGG وأن قطع MsPI فى السيتوسين الداخلى تحدث لها مثللة . الدنا من الكولونات المقاومة قطعت بشكل مختلف بواسطة الأنزيمين المحددين بينما مع الكولونات المرتدة كانت نظام الحزم متساوية ومتماثلة (الشكل ٥-٤) . يبدو أن نقص المثللة خفضت من استنساخ كلا من جينات E4 , FE4 وكان ذلك مصحوبا بفقد المقاومة فى من الخوخ . هذا على عكس كامل مع غالبية الكائنات الدقيقة الأخرى حيث فقد مثللة الدنا بعد إشارة لبداية الاستنساخ . ليس أى من مواقع MsPI فى دنا استريز E4 المكلون تكون أعلى منطقة التشفير ولكن إذا أمكن تعريف مواقع المثللة فى منطق البادىء أو المحفز قد يفتح الآفاق للتحكم فى المثللة والتغلب ومنع المقاومة .



شكل (٥-٤) : بقع ساوثرن للدنا المستخلص من كولونات المقاومة للمبيد (R3 , R1) والحساسة المرتدة Rev والجس مع استريز DNA , E4 . الدنا كان مقيدا مع MsPI(M) , II(H) . الاسهم تشير الى حجم الحزم الكبرى .

تأثير الطرق الجزيئية على المقاييس العملية لمجابهة المقاومة

الأمثلة التى نوقشت قبلا ألقت الضوء على كيف يمكن أن تستخدم الطرق المختلفة فى زيادة الفهم عن تقنيات المقاومة على المستوى الجزيئى . كيف أن هذه الموجدات تحسن من استراتيجيات مجابهة وإيقاف المقاومة ؟ الأن تم هندسة العديد من الأصناف النباتية المقاومة لمبيدات الحشائش فى بعض المحاصيل بعد تمييز وعزل جينات المقاومة لمبيد الحشائش من النباتات المختلفة والكائنات الدقيقة لمدى واسع من المبيدات القاتلة للحشائش. التقدم ناحية إدخال هذه الأصناف الجديدة فى النظم المحصولية ستناقش فيما بعد على أمل أن نجد طريق من خلالها تزيد من مدى بدائل مبيدات الحشائش المتاحة للاستخدام فى استراتيجيات المجابهة والتغلب على مشاكل المقاومة للمبيدات . بالرغم من أنه يبدو أن المركب الجديد له طريقة إحداث فعل من النواتج الموجودة فانه يصبح من الصعوبة بمكان تعريف كيفية إحداث الفعل بدقة باستخدام الاقترابات البيوكيميائية التقليدية . الانتخاب من أجل المقاومة وحيدة الجين للمركب الجديد ومن ثم كلونة وتتابع الجين المشترك قد توجه الاهتمام نحو الانزيم المستهدف المشترك إذا كان التتابع المتجانس الكافى موجودا مع الجينات المعروفة فى قواعد المعلومات . لقد استخدم هذا الاقتراب فعلا لتعريف تقنية المقاومة فى طفرات A.nidulars المنتخب بواسطة قسم جديد من المبيدات الفطرية (Gustaffson ، واخرون ، ١٩٩٠) والتى تؤدى مباشرة الى تحديد طريقة إحداث الفعل .

كلونة نفس الجين المستهدف من الفطر والنبات والحشرة والتعبير عن كل ذلك فى الخميرة أو بعض الكائنات المعروفة جيدا تسمح بعمل تفرقة سريعة للكيمياء الجديدة وتعريف معظم الكيميائيات المبشرة وإدخالها فى فحوص واختبارات متقدمة باستخدام الكائنات الحية المستهدفة . التعبير عن الجنس المقابل فى الثدييات بنفس الطريقة يمكن الحصول على معلومات مبكرة عن توكسيكولوجيا المركب الجديد . البيولوجيا الجزيئية تقدم طرق أكثر فاعلية لتحديد وتمييز نشاط المركب الجديد وتحسين البيانات الخاصة بالعلاقة بين التركيب والفاعلية إذا كانت الجينات المستهدفة من الممرض الفعلى أو الآفة أو الحشائش المستهدفة . الازدواج مع طرق التفرقة بين المركبات هذه فان الاقترابات الجزيئية فى اتساع دائرة الفهم البيوكيميائى لمسارات التمثيل فى الفطريات بما فيها التخليق الحيوى للتوكسينات الطبيعية سوف تساعد فى البحث عن مواقع مستهدفة جديدة . أية مركبات جديدة سوف تلعب بالتأكيد دورا هاما فى استراتيجيات المجابهة والتغلب وإيقاف مشكلة المقاومة . التحويرات الوراثية لوسائل المكافحة البيولوجية قد تساعد فى تحسين فاعليتها بما يسمح توسيع دائرة استخدامها خاصة مع النظم المحصولية فى الخارج (ليست المحمية) . نقل جينات المقاومة للمبيد الفطرى الى الفطر الذى يحقق مكافحة فعالة للحشائش أو الافات أو

الأمراض سوف تسمح بالمكافحة البيولوجية والكيميائية تتكامل فى معايير وسائل المكافحة المتواصلة .

استخدام الطرق البيوكيميائية والسيرولوجية للكشف عن المقاومة

تحسين فهم تقنيات المقاومة للمبيد تقدم فرص لتطوير طرق التحليل البيوكيميائى والتى تشخص حدوث المقاومة بسرعة وبدقة . الاختبارات السريعة على المدى الواسع للكشف عن المقاومة للمبيد تستخدم بشكل روتينى بناء على تكنولوجيا الأطباق الميكروبيولوجية الدقيقة وقياس حركية تثبيط الاسيتايل كولين استريز (Devonshire ، ١٩٩٠) . حيث أن هذه الانزيمات تزداد بشكل كبير فى الحشرات المقاومة فان هذه الاختبارات قد تصلح للكشف عن المقاومة فى أفراد الحشرات وحتى التمييز بين تباينات الاسترازات المشفرة من خلال الالليلات المختلفة (Moores وآخرون ، ١٩٨٨) . بالرغم من الاعتماد الكبير على أى نموذج للوسيط يستخدم فى التحليل والمقاومة للمبيدات الفوسفورية والكاربامات قد تنتج من تغير الأنشطة الانزيمية والتى لم يكشف عنها فى التحليل . قد تحدث تعقيدات عند تحليل الحشرات مباشرة من المحاصيل المعاملة بسبب التواجد العالى للانزيم فى الحشرات المقاومة قد لا تشبع بالمبيد . إزالة الحشرات الى بيئة خالية من المبيد الحشرى حيث يحدث شفاء للانزيم يمكن قياس النشاط الكلى للاستريز بشكل دقيق . طرق التحليل البسيط هذه تسمح بتتبع موقف المقاومة للمبيد الحشرى فى العديد من الآفات الحشرية قريبة من بعضها (Byrne وآخرون ، ١٩٩٢) .

لقد كانت محاولات استخدام السيرولوجى للكشف عن المقاومة للمبيدات أقل نجاحا. الأجسام المضادة وحيدة الكلونة (mAbs) متخصصة للببتيدات المخلقة القصيرة بناء على تتابع بيتا – توبيلوين فى N.Crassa المحيطة بالحمض الأمينى ١٦٧ استخدمت للتمييز بين المستخلصات من الكونيديا لهذا الفطر من السلالات الحساسة والمقاومة لمركبات MBC من البطش الساوثرنية (Martin وآخرون ، ١٩٩٣) . كما كان متوقعا ربما أن هذه التقنية mAbs لا تستطيع تشخيص المقاومة فى B.cinerea حيث ان الحمض الأمينى ١٦٧ لايتغير فى السلالات المقاومة (جدول ٥–١) . لسوء الحظ فان التقييم المناعى فشل فى الاختبارات فى صور ELISA .

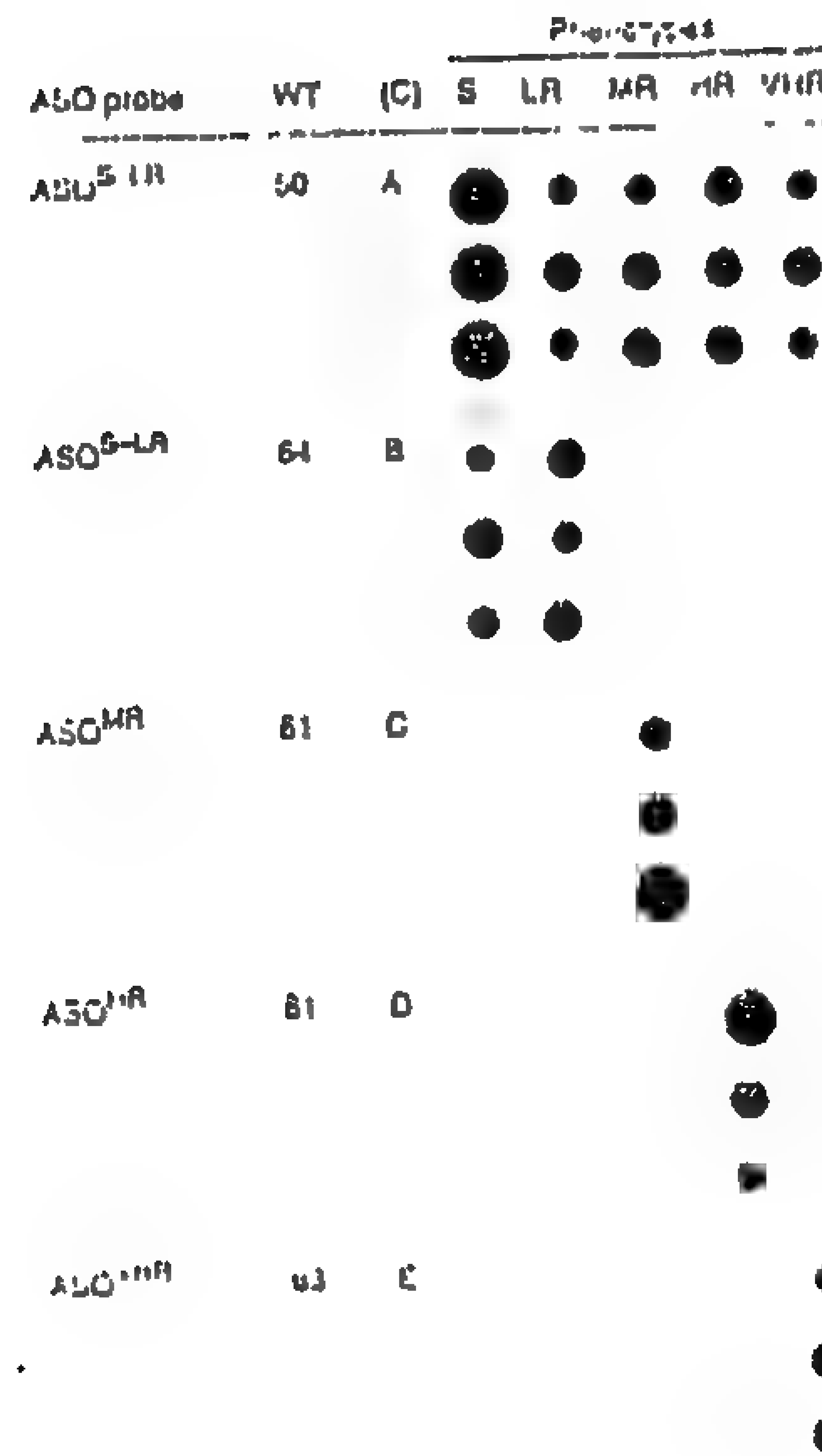
استخدام PCR والتكنولوجيا المرتبطة للكشف عن المقاومة

لقد فتحت اختبارات تفاعل سلسلة البوليميريز PCR والتكنولوجيات المرتبطة بها مجال واسع جديد فى نظم الكشف كما ان الدمج مع النيوكلوتيدات المحدودة ذات الالليل المتخصص (ASOs) ذات تأثير كبير ومعنوى على الكشف عن الطفرات الموضعية

خاصة فى حالات تشخيص الخلل الوراثى فى الإنسان . التكبير الالليلى المتخصص لشرائح الجين الخاص بالمقاومة أو الحساسية قد يتحقق باستخدام ASOs مباشـــرة كبـــادىء للــ PCR (Williams ، وآخرون ، ١٩٩٠) . فى هذا النظام فان زوج القاعدة غير المنسجم فى نهاية الموضع (`3) لبادىء PCR تحت ظروف الحماية المناسبة فى حالة ما إذا كـــان هناك إنسجام تام بين البادىء والصفيحة الجينومية فانه سوف ينتج منتج PCR بحجم متوقع يمكن أيضاحه وإظهاره على الفرد الكهربى بالجيل . التكبير للالليل المتخصـــص للســلالة المقاومة لمركبات MBC وتتابعات البيتا توبيولين النـــاتج مـــن الدنـــا الجينومـــى للفطــر B.cinerea التى استخدمت هذا الاتجاه لم تنجح . فى التكبير الأول فقط لشريحة دنا غـــير متخصصة 879 bp وباستخدام هذه الشريحة كصفيحة فى العش الثـــانىPCR – Aso تحصل كما كان متوقعا على الشريحة المكبرة 310 bp (Martin وآخـــرون ، ١٩٩٢) . بالإضافة الى ذلك ولتحقيق تخصصية تذيل البادئات ASO عند نهاية الموقع (`5) مع تتابع لا يرتبط بالجين بيتا كوبولين لتقليل قابلية البادىء غير المتخصص فـــى Taq بوليمـــيريز (جيفرى واخرون ، ١٩٩١) .

عدم اليقين فى تفاعلات البادئات – PCR أدت الـــى الاقـــتراح بضـــرورة اتخـــاذ الحرص والحيطة عند تعريف نواتج PCR بشكل منفرد بناء على حركتها علـــى وحـــدات الفصل الكهربى . لقد تم تصحيح ستة سلالات من سبعة فى الفطر B.cinerea من حيـــث التشخيص عن هذا الطريق . لقد أظهر تحليل سبعة عشر سلالة وجود مستوى متوسط مـــن المقاومة لمركب MBC ولسوء الحظ لا توجد بيانات عن تتابع "الدنا" لتعريف التغير فـــى "الدنا" الذى يسبب المقاومة فى هذه السلالة . لقد استخدم اقـــتراب بديـــل مجســـات ASO للتهجين المباشر لجينوم "الدنا" دوت – يلوث إلى أغشية النايلون . غسيل الأغشـــية تحـــت ظروف مناسبة عندما يكون هناك انسجام بين ASO والتتابع المستهدف يؤدى الى حـــدوث التهجين . من الناحية العملية استخدمت شريحة PCR المكبرة للدنا الجينومى تحتوى علـــى التتابع المتوقع عنه فى حالة الدنا الجينومى الكلى للتأكيد على أن الدنا المســـتهدف الكـــافى موجود خاصة فى حالة العينات الصغيرة كما هو الحال مع اشتراك مواضع مرضية فردية. باستخدام هذا الاقتراب وتكبير ١,٢ Kb لجين البيتـــاتوبولين للفطـــر V.inaequalis تـــم تصحيح تشخيص ٢٥ عزلة من عزلات جرب التفاح على المستويات المحلية والدولية وكان التشخيص كعزلات حساسة ومتوسطة المقاومة (MR) وعاليـــة المقاومـــة (HR) وعاليـــة المقاومة جدا (VHR) للمبيدات الفطرية MBC (الشكل ٥–٥) . لتحقيق ذاك ا :نت أربعـــة ASOs معلمة كل منها مع نيوكلوتيد مختلف فى وسط المجس تقابل التغيرات المعروفة فـــى

كودون الحمض الأمينى ١٩٨ أو ٢٠٠ . حالة واحدة فقط شخصت بشكل غير صحيح وهى عزلة جرثومية فردية متوسطة المقاومة حيث استخدم كودون بديل للفيروسين عند كـــودون الحمض الأمينى ٢٠٠ . السلالات ذات مستوى المقاومة القليلة (LR) لم تتغير فـــى هـــذه المنطقة لدنا البيتا توبولين حيث لم يمكن تمييزها عـــن الســـلالات الحساســـة . تشـــخيص المقاومة لمركب MBC فى نواتج PCR ١,٢ Kb من مناطق ضرر جرب التفاح عما هـــو الحال فى مزارع V.inaqualis كانت ممكنة ومن ثم تم تصحيح وضع المقاومة فـــى ١٢ موضع ضرر فحصت بشكل سليم على أنها حساسة أو مقاومة جدا لمبيدات MBC .



شكل (٥-٥) : الكشف عن المقاومة لمركبات MBC فى الفطر V.inaequalis

طرق PCR – ASO تستطيع الكشف عن المقاومة خلال ٢٤ – ٤٨ ساعة بما يسمح بالاستفادة من النتائج فى اتخاذ قرار الرش . بالرغم من أن كلا طريقة الفصل الكهربى لمنتجات PCR وطرق التهجين المبنى على الغشاء غير كمية فان هناك حاجة لتحسين هذه الاتجاهات والوسائل فى التحليل إذا كان الهدف منها تحقيق غرض عملية خارج نطاق المعامل . يمكن أن يجرى اختبار PCR فى أطباق دقيقة كما يمكن أن تتضمن حدوث تهجين فى نفس الممرات فى الطبق . ربط هذا الاقتراب مع طريقة الكشف بطريقة الاختبار المناعى ELIIS سوف يقدم طريقة تحليل سريعة ودقيقة تمكن من تحليل العدد من العينات فى وقت قصير . تجرى فى الوقت الحالى مجهودات كبيرة مباشرة لتحسين وتنقية تكنولوجيا ASO – PCR على امتداد هذه الخطوط خاصة فيما يربطها بالكشف عن الخلل الوظيفى فى الإنسان وكذلك تطوير هذه الاقترابات للكشف عن المقاومة للمبيدات وسوف نناقش هذا الموضوع لاحقا فى هذا الكتاب إن شاء الله سبحانه وتعالى (Hollomon and Butters ، ١٩٩٢) . تحسين دقة استكشاف المقاومة من خلال الالليلات المشتركة وعدد العينات المستخدمة لا تؤدى الى الكشف المبكر فقط ولكنها تساعد فى تقييم الاستراتيجيات التى تستهدف التغلب على هذه المشكلة وتفتح الطريق كذلك الى توضيح أهمية النماذج الرياضية فى التنبؤ بمسار مشكلة المقاومة لفعل المبيدات .

REFERENCES

Brattsten, L.B. (1990). Resistance mechanisms to carbamate and organophosphate insecticides, in Managing Resistance to Agrochemicals: From Fundamental Research to Practical Strategies, (eds M.B. Green, H.M. le Baron and W.K. Moberg). ACS Symposium Series 421, ACS, Washington, DC, pp. 42-60.

Brown, T.M. (1990). Biochemical and genetic mechanisms of insecticide resistance, in Managing Resistance to Agrochemicals: From Fundamental Research to Practical Strategies, (eds M.B. Green, H.M. le Baron and W.K. Moberg), ACS Symposium Series 421. ACS, Washington, DC, pp. 61-76.

Byme, F.J., Denholm, I. Birnie, L.C., Devonshire, A.L. and Rowland, M.W. (1992). Analysis of insecticide resistance in the white fly, Bemisia tobaci, in Resistance 91: Achievements and Developments in Combatting Pesticide Resistance, (eds I. Denholm, A.L. Devonshire and D.W. Hollomon), Elsevier, London, pp. 165-78.

Cooley, R.N. and Caton, C.L. (1993). Molecular analysis of the Septoria nodorum B-tubulin gene and characterisation of a benomyl-resistance mutation. Molecular General Genetics, 287, 58-61.

Crute, I.R. (1992). The contribution of genetic studies to understanding fungicide resistance, in Resistance 91: Achievements and Developments in combating Pesticide Resistance, (eds I. Denholm, A.I. Devonshire and D.W. Hollomon), Elsevier, London, pp. 190-202.

Davidse, L.C. and Flach, W. (1977). Differenital binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this anti-mitotic agent in mutant strans of Aspergillus nidulans. Journal of Cell Biology, 72, 174-93.

DeWaard, M.A. and van Nistelrooy, J.G.M. (1982). Accumulation of SBI fungicides in a wild-type and fenarimol-resistant isolates of Penicillum italicum. Pesticide Science, 22, 371-82.

Fuerst, E.P., Nakatami, H.Y., Dodge, A.D. Penner, D. and Arntzen, C.J. (1985). Paraquat resistance in Conyza Plant Physiology, 77, 984-9.

Fujimura, M., Oeda, K..Inove, H. and Kato, T. (1990). Mechanism of action of N-phenylcarbamates in benzimidazole-resistant Neurospora strains, in Managing Resistance to Agrochemicals: From Fundamental Research to Practical Strategies, (eds M.B. Green, H.M. Le Baron and W.K. Moberg), ACS Symposium Series 421, Washington DC, pp. 224-36.

Gustaffson, G.D., Waldron, C., and Davis, G.E. (1990). Isolation of a DNA fragment that transforms Aspergillus nidulans to resistance to the antifungal compound LY 214352, presented at the Fourth international Mycological Conference, Regensburg, Abstract IIF-282/1.

Ishii, H., Iwasaki, S., Sato, Z. and Inoue, I. (1990). Binding of cellular protein from Venturia nashicola isolates to carbendazim. Its relationship with sensitivity to N-phenylcarbamates, N phenyl-formadoximes and Rhizoxin, in Managing Resistance to Agrochemicals: From Fundamental Research to Practical Strategies. (eds M.B. Green, H.M. Le Baron, and W.K. Moberg), ACS Symposium Series 421, ACS, Washington, DC, pp. 237-48.

Koenraadt, H. and Jones, A.LK. (1992). The use of allele-specific oligonucleotide probes to characterize resistance to benomyl in field strains of Venturia inaequalis. Phytopathology, 82, 1354-8.

Koenraadt, H., Somerville, S.C. and Jones, A.L. (1992). Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of Venturia inaequalis and other plant pathogenic fungi. Phytopathology, 82, 1348-54.

Martin, L.A., Fox, R.T.V., Baldwin, B.C. and Connerton, I.F. (1992). Use of polymerase chain reaction for the diagnosis of MBC resistance in Botrytis cinerea, in Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseqses 1992. The British Crop Protection Council. Farnham, UK, pp. 207-14.

May, G.S., Tsang, L.S., Smith, H., Fifel, S. and Morris, N.R. (1987). Aspergillus nidulans beta-tubulin genes are unusually divergent. Gene, 55, 231-43.

Orbach, H.J., Porro, E.B., and Yanofsky, C. (1986). Cloning and characterization of the gene for B-tubulin from a benomyl resistant mutant of Neurospora crossa, and its use as a dominant selectable marker Molecular and Cellular Biology, 6, 2452-61.

Osmani, S.A. and Oakley, B.R. (1991). Cell cycle and tubulin mutations in filamentous fungi, in More gene manipulations in fungi, (eds J.W. Benaett and L.L. Lasure), Academic Press, London, pp. 107-25.

Ray, T.B. (1984). Site of action of chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. Plant Physiology, 75, 827-31.

Snustad, D.P. Haas, N.A., Kopczak, S.D. and Silflow, C.D. (1992). The small genome of Arabidopsis contains at least nine expressed B-tubulin genes. Plant Cell, 4. 549-56.

Thomas, J.H., Neff, N.F. and Botstein, D. (1985). Isolation and characterisation mutations in the B-tubulin gene of Saccharomyces cerevisiae. Genetics, 112, 715-34.

van Rensen, J.J.S. and de Vos, OP.J. (1992). Biochemical mechanisms of resistance to photosystem II herbicides, in Resistance 91: Achievements and Developments in Combatting Pesticide Resistance, (eds I. Denholm, A.L. Devonshire and D.W. Hollomon). Elsever, London, pp. 251-61.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J. Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 12, 6531-5.

الباب السادس
التكنولوجيا الحيوية والمكافحة الحيوية للآفات

مقدمــــــــة :

بعد أن انتهيت من الأبواب الخمسة السابقة بداية بالتعريف بالتكنولوجيـــا الحيويـــة والجزيئية والآمال المعلقة عليها فى تحقيق الأمن الغذائى لبنى البشر وتقليل الفاقد الزراعـــى الذى تحدثه الآفات وما أستتبع ذلك من تناول البعد الأول للتحسين الوراثـــى للنباتـــات بمـــا يحقق زيادة الإنتاج الزراعى وجودة الإنتاج من خلال الدور الفعال الذى يضطلع به مربـــى النباتات . جاء الباب الثالث لكى يلقى الضوء عن الاقترابات الجزيئيـــة للحصـــول علـــى كيميائيات تهدف الى وقاية وحماية المزروعات من غولاء الآفات الضارية متبوعا فى الباب الرابع بدور وإمكانيات هذه التكنولوجيا الجزيئية فى الحصول على مـــواد حيويـــة لحمايـــة النباتات . الباب الخامس تناول المحددات الجزيئية لتحقيق المقاومة النباتية ضـــد النباتـــات بأنواعها المختلفة خاصة مبيدات الحشائش والفطريات والحشرات . بعـــد هـــذه الأبـــواب الخمسة كان المفروض أن يتناول الباب السادس دور البيولوجيا الجزيئة والهندسة الوراثيـــة فى تحسين مقاومة النباتات للأمراض النباتية ولكنى آثرت أن أكسر حدة هـــذه الاقترابـــات الصعبة الجافة فى مادتها العلمية وأن أفسح المجال لبعض الموضوعات أو دراسات حالـــة عن اقترابات التكنولوجيا الحيوية وإمكانية الحصول على وسائل تحقيق المكافحـــة الحيويـــة للآفات . لقد وجدت ضالتى فى الإصدار بعنوان " إدارة الآفـــات والبيئـــة : مســـتقبل إدارة مجابهة الآفات فى صحة النبات والزراعة المتواصلة " إعداد زميلى الفـــاضل أ.د. نبيـــل منصور أستاذ كيمياء المبيدات والسموم بكلية الزراعة جامعة الإسكندرية ومقـــرر مؤتمـــر "صحة النبات" الذى عقد بمدينة الفيوم فى الفترة ٢١ – ٢٤ مارس ، ١٩٩٤ وشـــارك فيـــه العديد من الخبراء فى مجالات مكافحة الآفات والتكنولوجيا الحيوية وتطبيقـــات المبيـــدات التشريعية البيئية خاصة ما يتعلق بالنواحى الزراعية . لقد أفـــرد بـــاب كبـــير لموضـــوع التكنولوجيا الحيوية والمكافحة الحيوية وهو ما سأتناوله فى هذا المقام بإذن الله .

الفصل الأول

المقاومة النباتية والتكنولوجيا الحيوية وصحة النبات

مقدمـــــــة :

هذا الموضوع تناوله أ.د كمال الزك وأ.د. بيجى ساكستون بقسم علوم الأراضـــى والمحاصيل بجامعة تكساس A & m بالولايـــات المتحـــدة الأمريكيـــة . بـــدأ الموضـــوع باستعراض عن المصادر الطبيعية المتوفرة على كوكب الأرض وضرورة الاستغلال الأمثل لها والحفاظ عليها كافية صالحة للأجيال التالية . مقاومة العائل النباتى من أقدم الطرق فـــى مكافحة الآفات التى تصيب المزروعات . لقد تأكد أن الاختلافات فى الحساســية للإصابــة بالأمراض بين الزراعات المختلفة ذات أهمية منذ القدم كما ميزها العــالم Theophrastus فى أوائل القرن الثالث قبل الميلاد . فى المقابل تم تمييز المقاومة النباتية ضـــد الحشـــرات والأمراض النباتية فى القرن التاسع عشر ولكن التطور الحقيقى فى تطوير نباتات مقاومـــة للآفات لم يكن ممكنا حتى ما بعد اكتشاف مندل عن قوانين الوراثة عام ١٩٠٠ . الجينـــات النباتية تحمل العديد من المعلومات التى تتحكم فى وظائف النباتات واســـتجابتها للظـــروف البيئية وكذلك للضغوط الحيوية وغير الحيوية . الجينات لا تحدث بالصدفة ولكنها تحتـــاج وقت كافى حيث تحدث خلال التطور والبقاء واللياقة والتحوير بواسطة الإنسان .

لقد استخدم الدكتور الزك القطن كمثال بسبب القاعدة البحثية العريضة التى تعـــرض لها والإنجازات التى تحققت معه فى اتجاه المقاومة النباتية للآفات وأهميته الاقتصادية علـــى مستوى العالم . تعتمد حياة أى صناعة على تطوير منتجات محسنة وجديدة من ناحيتى الكم والكيف . المقاومة النباتية للآفات ذات أهمية حرجة ومحددة فى إنتاج القطن . الفقد بواسطة الآفات والضغوط التى يتعرض لها القطن تخفض بشكل معنوى مـــن الإنتاجيـــة والجـــودة وصفات التيلة والبذور علاوة على زيادة التكلفة . لقد أصبحت الحاجـــة لتطويـــر وتنفيـــذ استراتيجيات بديلة فى مكافحة الآفات مطلب أساسى على المستويات المحليـــة والدوليـــة . الهدف الأول لبرامج التحسين الوراثى للنباتات بما يحقق المقاومة للآفات والضغـــوط فـــى القطن يتمثل فى تطوير أصناف نباتية تقاوم واحد أو اكثر من الآفـــات كذلـــك تحســـين أو الحفاظ على الصفات النباتية المميزة والإنتاجية وجودة الألياف والبذور . الســـيطرة وإدارة التعامل مع الآفات تعتبر جزء من الإنتاج الشامل للمحصـــول فـــى القطـــن وغـــيره مـــن الزراعات. أن توفر أصناف نباتية محورة وبنوك جينات ذات مستويات عالية من المقاومـــة النباتية الوراثية للعديد من الآفات والضغوط البيئية ضرورية بل ذات ضـــرورة خاصـــة . التقدم فى تربية أصناف القطن المحسنة حدث بسرعة فى السنوات العشـــرين الماضيـــة .

خلال نفس الفترة حدثت تطورات كبيرة فى مفاهيم التربية وطرق الحصول على أصناف نباتية مقاومة للآفات .

قيمة الأصناف المقاومة فى الإدارة المتكاملة للآفات والزراعة المتواصلة

من الاعتبارات المحددة فى الزراعة الحديثة كيفية الحفاظ على وصيانة صحة النباتات خلال موسم النمو وهذا يتطلب اتخاذ كل السبل والاقترابات لتحقيق ذلك من خلال النواحى الوراثية الخاصة بالكم والكيف . الصحة النباتية تعنى التحرر النسبى للنباتات من الضغوط الحيوية واللا حيوية . حتى الآن لم نتمكن من تحقيق الصحة الكاملة للنباتات ومدى المردودات منها . لقد تم تقدير أننا حققنا ٦٠% من المقدرة الوراثية لنباتات القطن بسبب الفقد الذى تسببه الآفات والضغوط البيئية (EL-Zik and Thaxton ، ١٩٨٩) . التحدى الرئيسى الذى يؤثر على إنتاجية وجودة القطن الحشرات والأمراض النباتية والنيماتودا والضغوط البيئية . عندما تهاجم النباتات بأى آفة حشرية أو غيرها فان واحدة أو أكثر من الوظائف النباتية سوف تتغير . لقد كان منع الإصابات الوبائية بالآفات وتقليل الفاقد فى الإنتاجية والجودة ذات أهمية واهتمام خاص . الإدارة الناجحة للمحصول تحد وتقلل من التأثيرات غير المرغوبة التى تحدثها الآفات والضغوط البيئية وتعظيم الفوائد والإيجابيات .

من الناحية التاريخية تم تطوير أصناف قطن جديدة لمقابلة التغيير الذى استجد فى احتياجات وطلبات منتجى وصناع القطن بما فيها صناعات الغزل . لقد تم تطوير مدى واسع من أصناف القطن من خلال التربية وسوف تستمر عملية التطوير لمجابهة التغييرات فى طلبات ومواصفات الغزل والتغيرات فى العمليات الزراعية والميكنة والظروف البيئية وضغوط الآفات . من أكبر الألويات فى برامج التربية تحقيق الإنتاجية العالية والجودة وهما مطلبان يجابهان العديد من التحديات . يحتمل أن يكون اختيار الصنف هو القرار الوحيد الذى يتخذه مزارع القطن فى نظام الإدارة المتكاملة للمحصول (ICMS) . لقد أشار الزيك (١٩٨٥) أن الصنف مازال يمثل الاطار الخاص بمستوى الحساسية للآفات والتكتيكات التى تستخدم لإدارة المحصول وكذلك تكاليف الإنتاج . الأصناف النباتية المقاومة تقدم حجر الزاوية لأى نظام ناجح للإدارة المتكاملة للآفات (IPM) . الأصناف المقاومة حتى تلك التى تملك مستويات منخفضة أو متوسطة للمقاومة ذات توافق عالى مع جميع التكتيكات الأخرى وسوف تساهم بثبات فى تحقيق مميزات كبيرة فى IPM والزراعة المتواصلة . المقاومة قد تكون عامل يساهم فى المنظومة الإنتاجية أو مجرد وسائل أولية فى مكافحة الآفات . المقاومة الوراثية يجب أن تتناسق وتتكامل مع الوسائل الأخرى للمكافحة والتى تتضمن الاقترابات الزراعية والحيوية والكيميائية . الأصناف المقاومة قد لا تتطلب معاملات متعددة أو معدلات عالية من استخدام المبيدات لتحقيق مكافحة ملائمة الآفات . هذا

يؤدى الى خفض تكاليف الإنتاج والخطر وزيادة الفوائد والعائدات . المقاومة الوراثية تعتبر كأحسن الوسائل الفعالة والاقتصادية والعقلانية للحفاظ على صحة النباتات وتقليل الفقد المحصولى .

مستويات المقاومة

المقاومة للآفات تعتبر سمة نباتية نسبية أكثر منها صفة كيفية مطلقة . المقاومة الوراثية عبارة عن صفة وراثية تؤدى الى خفض مجموع الآفة أو تقليل الضرر الذى تحدثه. قيمة ودرجة المقاومة تتراوح من الحساسية العالية وحتى المناعة . عندما يجرى تقييم الجيرمبلازم للمقاومة للعديد من الظروف المعاكسة كما فى برنامج المقاومة المتعددة للظروف المعاكسة Multi – Advesity Resistance (MAR) فان مستويات التعبير عن الطرز الفينولوجية والوراثية للضرر يجب أن تحدد نوعيا وكميا . التعبير العوائلى يتراوح من المناعة ، المقاومة العالية ، المقاومة ، المقاومة المتوسطة ، المقاومة الجزئية والحساسية وحتى الحساسية العالية . هذه الأقسام تعكس التعبير الفينولوجى للتلف الذى تحدثه الآفات وتوضح مستويات الإدارة المطلوبة للاستخدام الفعال فى المقاومة فى IPM وبرنامج IMS (جدول ٦-١) . تعتمد مستويات المقاومة على المقاييس الكيفية والكمية والمقارنات مع الأصناف القياسية والسلالات القياسية . الأصناف المرجعية لا توجد لسمات أو صفات نباتية جديدة . فى هذه الحالات يقارن التلف فى سلالات القطن بما هو موجود فى الصنف الحساس أو لصنف المقاومة المعامل بالمبيد أو لتحديد مستوى المقاومة . فهم المفهوم فى غاية الأهمية فى تمييز كل مستويات استجابة العائل . هذا سوف يساعد فى قياس التقدم الذى حدث وتحسين مستويات المقاومة النباتية للآفات .

جدول (٦-١) : نظام التقسيم MAR لمستويات المقاومة والإدارة المطلوبة للمكافحة الفعالة للآفات فى برامج IPM

مستوى مقاومة العائل	مستوى الإدارة المطلوب لتحقيق الاستخدام الفعال لمقاومة العائل
* المناعة (IM)	* يحقق العائل مكافحة كاملة للآفة
* مقاومة عالية (HR)	* يحقق العائل مستوى عالى من مكافحة الآفات
* مقاومة (R)	* يحقق العائل مكافحة مناسبة ولكنه قد يحتاج أقل عدد من المعاملات لتقليل مجموعة الآفة
* مقاومة متوسطة (IR)	* مطلوب معاملات قليلة لتقليل مجموع الآفة
* مقاومة جزئية (PR)	* مطلوب معاملات مخططة للحفاظ على تعداد الآفة منخفضا
* حساسة (S)	* يتطلب معاملات مستمرة لمكافحة الآفات
* عالية الحساسية (HS)	* يتطلب معاملات مكثفة لمكافحة الآفات

وراثية المقاومة Genetics of Resistance

قد توصف المقاومة بناء على طريقة تحقيق الوراثية على تأثيرات الجينات أو على مراحل نمو العائل النباتي . كذلك يمكن اعتبار المقاومة إحدى آليات الوبائية . المعلومات الخاصة عن الطبيعة الوراثية للمقاومة فى العائل ذات أهمية كبيرة فى برامج التربية . تقدم هذه المعلومات الأساس الكمي لإعادة الدمج والانتخاب وتعريف النواتج الجينية وعوامل المقاومة التى يفضل أن تكون ثابتة ضد المرونة الوراثية للآفة . بناء على كيفية عمل الوراثية تم التمييز بين ثلاثة أنواع من المقاومة : أحادية الجينات ، محدودة الجينات ومتعددة الجينات وفيها يتحكم فى المقاومة جين واحد أو قليل أو عديد من الجينات على التوالى . جينات المقاومة ذات التأثيرات الكبيرة التى يمكن تعريفها بسهولة يطلق عليها الجينات الكبرى major genes بينما تلك التى لها تأثير صغير على التعبير عن المقاومة جينات صغرى minor genes . فى القطن تم تحديد وتمييز الدور الهام للجينات الصغوى والمحورة على السمات الاقتصادية (الزيك وساكستون ، ١٩٨٩) . بالإضافة الى ذلك فان التعبير الخاص بالجينات الكبرى والصغرى تتأثر بالخلفية الوراثية .

المقاومة متعددة الجينات Polygenic تقدم تنظيم معتبر ضد الطرز المتخصصة للآفات . يمكن توجيه المقاومة متعددة الجينات بواسطة عدد من التقنيات المستقلة بعضها قد يكون تحت السيطرة بواسطة الجينات الكبرى والأخرى بالجينات الصغرى . المقاومة التى توجه بجينات عديدة عادة ما تكون أكثر دواما وأقل طرز أو سلالة متخصصة عن المقاومة التى يسيطر ويتحكم فيها عدد قليل من الجينات . المقاومة السيتوبلازمية أو العوامل الوراثية السيتوبلازمية ذات أهمية كبيرة فى المقاومة ضد بعض الممرضات النباتية ونفس الشىء وجد فى الحشرات . لقد وضعت مصطلحات عن المقاومة كانت أكثر شيوعا مع الأمراض النباتية بالمقارنة بالحشرات . هناك المقاومة الرأسية أو الخاصة للتعبير عن بعض الطرز الوراثية فى بعض الآفات وكذلك المقاومة الأفقية أو العامة للتعبير عن كل الطرز الوراثية لأنواع الآفات (Van der Pank ، ١٩٦٣) . المقاومة فائقة الحساسية تمثل استجابة سريعة ومكثفة تتميز بالموت قبل النضج (تكرزة) للنسيج المصاب جنبا الى جنب مع فقد النشاط وموضعية الوسيلة المهاجمة وقد وصف ذلك بواسطة Muller ، ١٩٥٩ .

المقاومة النباتية للافات تمكن النبات من تجنب أو تحمل أو الشفاء من تأثيرات الآفات التى تسبب تلف كبير للطرز الوراثية لنفس الأنواع تحت ظروف مشابهة . دفاع النباتات العوائل ضد الآفات قد ترجع الى التجنب وعدم التفضيل أو تقنيات المقاومة . بعض النباتات تتجنب العدوى (تجنب الآفة) لأنها ليست فى مرحلة شدة الحساسية عندما تكون

مجاميع الآفات فى قمتها . أى سمة وراثية للنبات العائل لا تشجع تغذية الآفة أو تكوين مستعمراتها أو لا تشجع وضع البيض بواسطة الآفة تجعل من النبات عائل غير مفضل . عدم التفضيل قد يرجع الى عوامل مورفولوجية أو فسيولوجية أو بيوكيميائية فى النبات العائل . التجنب يقلل فرصة الملامسة بين أنسجة العائل والآفة بينما المقاومة تلعب دورها عندما يصبح النسيج النباتى والآفة فى تلامس . معظم تقنيات التجنب عادة تكون مورفولوجية وتظهر فاعلية أكبر ضد الآفات الحشرية ولكنها قد تعمل كذلك ضد الآفات الفيروسية والبكتيرية والفطرية .

التربية بغرض تحقيق المقاومة للآفات تبدأ بتعريف مصادر المقاومة . احتمال المقاومة التى تحدث فى مجموع العائل ترتبط مباشرة لتنوع الجيرمبلازم المتاح . يوجد مدى واسع من مستويات المقاومة للآفات بين الأصناف النباتية بين النوع . فى العادة توجد اختلافات كبيرة بين الأنواع غير المرتبطة . من الأهمية الكبرى تطوير طرق للتفرقة وتقييم الجيرمبلازم وانعزلات المجاميع وتعرييف النباتات المقاومة للعديد من الآفات . لقد أشار Jenkins ، ١٩٨٢ ، ١٩٨٦ الى الابحاث التى أجراها منذ ما يزيد عن ٢٥ سنة حيث قام بتعريف السلالة G.hirsutum بها مستويات متفاوتة من المقاومة لدودة براعم الدخان ودودة اللوز القرنفلية وبق النبات وسوسة اللوز . لقد أشار الى أنه أمكن تعريف ٦٥ سلالة مقاومة لسوسة اللوز ، ٦١ مقاومة لدودة اللوز الأمريكية ، ٩٨ مقاومة لدودة اللوز القرنفلية، ١١ مقاوم لبق النباتات ، ٦ مقاومة للعنكبوت الأحمر . من الشائع وجود مقاومة لأكثر من آفة فى هذه السلالات (Jenkins، ١٩٨٦) . لقد نوقشت مقاومة جيرمبلازم القطن ضد دودة اللوز القرنفلية حديثا بواسطة Wilson ، ١٩٨٧ . لقد تحقق تقدم ملموس من قبل العديد من البحاث فى تحسين مقاومة جيرمبلازم القطن لدودة اللوز الأمريكية مع الحفاظ على الإنتاجية والجودة . بعض المربين العاملين فى اتجاه إنتاج سلالات من القطن سريعة الإثمار قصيرة الموسم نجحوا فى الحصول على سلالات مقاومة لدودة براعم الدخان .

لقد اتضح أن السيتوبلازم من الأنواع المختلفة من القطن تؤثر على المقاومة للحشرات . السيتوبلازم من الأصناف أربوريوم ، هيرباسيوم ، أنومالم ، هاركنسى ، هيرسوتوم وهى سلالات سيتوبلازمية عقيمة الذكورة ذات تأثيرات سالبة على مجاميع سوسة اللوز (Bowman وآخرون ، ١٩٨١) . هذه السيتوبلازمات ذات تأثير معاكس كذلك على الصفات النباتية . السيتوبلازم من الصنف G.tomentosum ذات تأثير سالب قليل على تطوير يرقات دودة اللوز الأمريكية (Meredith وآخرون ، ١٩٧٩) . سيتوبلازم الصنف أنومالوم ذات تأثير سالب بسيط على بق النباتات . منذ التسعينات نجح

البحاث فى تطوير جيرمبلازم وأصناف قطن مقاومة للأمراض النباتية . العديد من الأصناف المطورة أظهرت مقاومة لذبول الفيوزاريوم / نيماتودا تعقد الجذور بينما أظهرت أصناف قليلة مقاومة للفحة البكتيرية وذبول الفيرتيسيليوم . لقد نجح Hyer وآخرون (١٩٧٩) وشيبارد (١٩٨٧) فى تطوير جيرمبلازم ذات مقاومة عالية لنيماتودا تعقد الجذور. لقد نشرت نتائج العديد من الدراسات المرجعية عن وراثية وتقنيات ومصادر المقاومة وكذلك تربية أصناف قطن مقاومة للأمراض النباتية والحشرات ومنها Bird (١٩٧٣ ، ١٩٨٢)، El-Zik and Frisbie (١٩٨٥)، Jenkins (١٩٨٢ ، ١٩٨٦)، Jones (١٩٧٢ ، ١٩٨٢)، Maaxwel وآخرون (١٩٧٢) ... وغيرها .

اقترابات التربية Breeding approaches

هناك طرق عديدة للتحسين الوراثى للمحاصيل تحقيقا للمقاومة ضد الآفات عندما يؤخذ فى الاعتبار النواحى المختلفة للاختلافات بين العوائل النباتية ومصادر المقاومة والتباين بين الآفات والثبات الوراثى والمرونة والتأثيرات البيئية والحد الاقتصادى الحرج ومستوى الضرر للآفات . يتضمن التحسين الوراثى التربية لتحقيق المقاومة لآفة واحدة (حشرة واحدة أو ممرض نباتى واحد) أو أنواع متعددة من الآفات أو تنوع آفى متعدد (حشرات – ممرضات) بالإضافة الى الضغوط البيئية . تحقيق مستويات عالية من المقاومة للآفات والضغوط البيئية يجب أن تتوازى مع التحسين فى المحصول وجودة الألياف والبذور . التحسين فى القطن لتحقيق المقاومة لعدد قليل من الآفات أو الظروف المعاكسة ليست كافية فى الزراعة الحديثة .

فى الوقت الراهن تستغل اتجاه اختيار الأصول والأنساب فى معظم برامج تربية القطن . طريقة التربية المكثفة تستخدم تحت بعض الظروف وفيها يتأخر الانتخاب النباتى لأجيال قليلة للسماح بحدوث الانتخاب الطبيعى كى تعمل فى الأجيال المتتالية . العبور الرجعى كطريقة فعالة لنقل الجينات التى تسيطر على المقاومة لآفة أو صفة من مصادر معروفة للمقاومة فى الأصناف المعدلة . لقد نجح العلماء EL- Zik and Tnaxton (١٩٨٩) فى وضع التوزيع الهرمى للجينات المسئولة عن مجال واسع من المقاومة والضغوط غير الحيوية . لقد استخدم مفهومان وأسلوبان فى التربية النباتية لتحقيق مقاومة متعددة للآفات فى القطن : مقاومة متعددة للأمراض النباتية (Bird وآخرون ، ١٩٨٦ وغيرها) والمقاومة للظروف المعاكسة المتعددة (Elzik & Thaxton ، ١٩٨٩) . كل اقتراب قد استخدم بنجاح ولكنها اختلفت فيما بينها فى الأساليب ومعدل التقدم . الاقتراب التقليدى لتحقيق المقاومة المتعددة للأمراض النباتية استخدمت الانتخاب المباشر للجينات

المسئولة عن المقاومة لكل ممرض ثم دمجت الجينات المستقلة فى نفس الصنف . تربية القطن ذات المقاومة المتعددة للأمراض يتطلب مصادر متاحة لمقاومة معروفة والعديد من الجينات التى توجه المقاومة باستقلالية لكل مرض (Sappenfield وآخرون ، ١٩٨٠) . نظم الجين المحور الكبير / الصغير للمقاومة لممرض واحد تنقل للآفة المحورة . التعوض المتتابع فى المجموع الانعزالى لضغوط المرض قد تسمح بالكشف عن سلالات القطن عديدة أو متعددة المقاومة . المصادر المستقلة للمقاومة النباتية للأمراض التى يتحكم فيها معقدات الجين المحورة كبرى وصغرى عندما تندمج تعطى فى الغالب مقاومة متعددة للأمراض (Bird ، ١٩٧٥ ، Sappenfield ، ١٩٦٣) .

المقاومة المتعددة للظروف المعاكسة Multi – Adversity Resistance (MAR)

مفاهيم MAR والخطوات والطرق التى تبنى على المردودات من البحوث المكثفة التى أجريت فى الثلاثين سنة الماضية استخدمت لتطوير جيرمبلازم مقاوم للظروف المعاكسة المتعددة MAR . من المهام الشاقة الاتجاه نحو الانتخاب المباشر للمقاومة لكل آفة وظرف بيئى معاكس يؤثر على محصولية القطن . النظام الخاص بالانتخاب المباشر لصفات نباتية قليلة (من أربعة الى ستة) والتى تحسن بشكل غير مباشر من مستويات الصفات الأخرى الباقية سوف تحقق تحسين وراثى بسيط . العامل المحدد فى برنامج MAR هو تحديد أى الصفات ترتبط بشكل مباشر . البرنامج MAR يستخدم انتخاب مباشر أو غير مباشر للتقاوي أو البادرات أو النبات وكذلك طرق الانتخاب النباتى فى القطن للتحسين الوراثى المتتابع للمقاومة للآفات والضغوط البيئية بالإضافة الى الإنتاج المحصولى العالى والتبكير والصفات النباتية والتحمل للجفاف وجودة التقاوى والإنتاج العالى من الألياف . لقد اعتبرت ٥٢ صفة فى برنامج MAR بداية من تحقيق النمو الجيد والمقاومة للآفات وحتى المحصول ومكوناته وجودة الألياف .

طرق وخطوات الحصول على أصناف ذات مقاومة للظروف المعاكسة المتعددة MAR

الانتخاب المباشر فى المعمل والصوب يجرى عمليا للصفات الأربعة التالية :

١-مقاومة غلاف البذور للعفن .
٢-معدل بطيء لاستطالة الساق (عند إزالة الزغب تحفظ البذور غير المعاملة على درجة حرارة ١٣,٣°م لمدة ثمانية أيام فى حضانة) .
٣-المقاومة للمسبب لمرض اللفحة البكتيرية .
٤-المقاومة لممرضات البادرات المتسببة عن الريزوكتونيا سولانى والبيثيوم التعميم .

الإنتخاب المباشر للصفات الأربعة تحقق مكاسب وراثية غير مباشرة فى المقاومة للأمراض الكبرى والحشرات بالإضافة الى تحقيق إنتاجية عالية وتبكير فى النضج وتحسين جودة الألياف والتقاوى . استخدام نظام MAR حقق نجاح كبير فى تطوير أصناف قطن جديدة وجيدة . التحسين الوراثى ضد الظروف المعاكسة المتعددة MAR تتضمن اختبارات مكثفة على مستوى المهل والصوبة والحقل وضرورة إجراء التقييم فى عشرة مواقع . هذه الطرق جعلت من الممكن تعريف سلالات القطن مع العديد من الصفات المطلوبة . الاختبارات الحقلية ذات القشرة مواقع فى تكساس من جنوب حتى شمال تكساس مما يمثل مدى واسع من البيئات المتنوعة بما فيها ضغوط نقص الماء من المتوسط حتى الشدة والضغوط من الحشرات والأمراض . السلالات المتقدمة قيمت كذلك فى مناطق متعددة فى نطاق حزام القطن بالولايات المتحدة الأمريكية .

نظام تربية القطن MAR موضح فى الشكل (٦-١) . كل عام يتم تقييم حوالى ٤٥٠ سلالة عبورية تمثل ٦٠ عبور مندمج فى الحقل من بين صفوة السلالات جيرمبلازم MAR والأنواع الأبوية . يتم زرع السلالات العبورية فى الصوبة ويتم تقييمها من ناحية المقاومة للممرض المسبب للفحة البكتريا وبعد ذلك تزرع التقاوى من الجيل الأول فى الحقل. كل سنة تدخل ٨٠ ألف بذرة تمثل ٥٠٠ فرد نباتى من الجيل الثانى وانتخابات النسل فى خطوط الحقول يتم انتخابها مع طرق MAR فى المعمل والصوبة . يتم انتخاب حوالى ١٥ ألف بذرة نظيفة خالية من أية نموات عفن وبها معدل بطيء لاستطالة الساق ثم تزرع فى أكواب وتوضع فى الصوبة . لقد تم عدوى حوالى ١٠ آلاف بادرة بمخلوط من أربعة سلالات من ممرض بكتريا اللفحة (زانثوموناس كامبيستريس) . التفاعلات البكتيرية تم شتلها فى أصص (٣٠٠٠) . تم انتخاب حوالى ٢٠٠٠ نبات وإنتاج التقاوى فى الصوبة خلال الشتاء . الألف نبات الأخرى تزال ويتخلص منها بسبب حساسيتها للحشرات وتساقط الثمار والتأخير فى النضج والصفات النباتية غير المرغوبة .

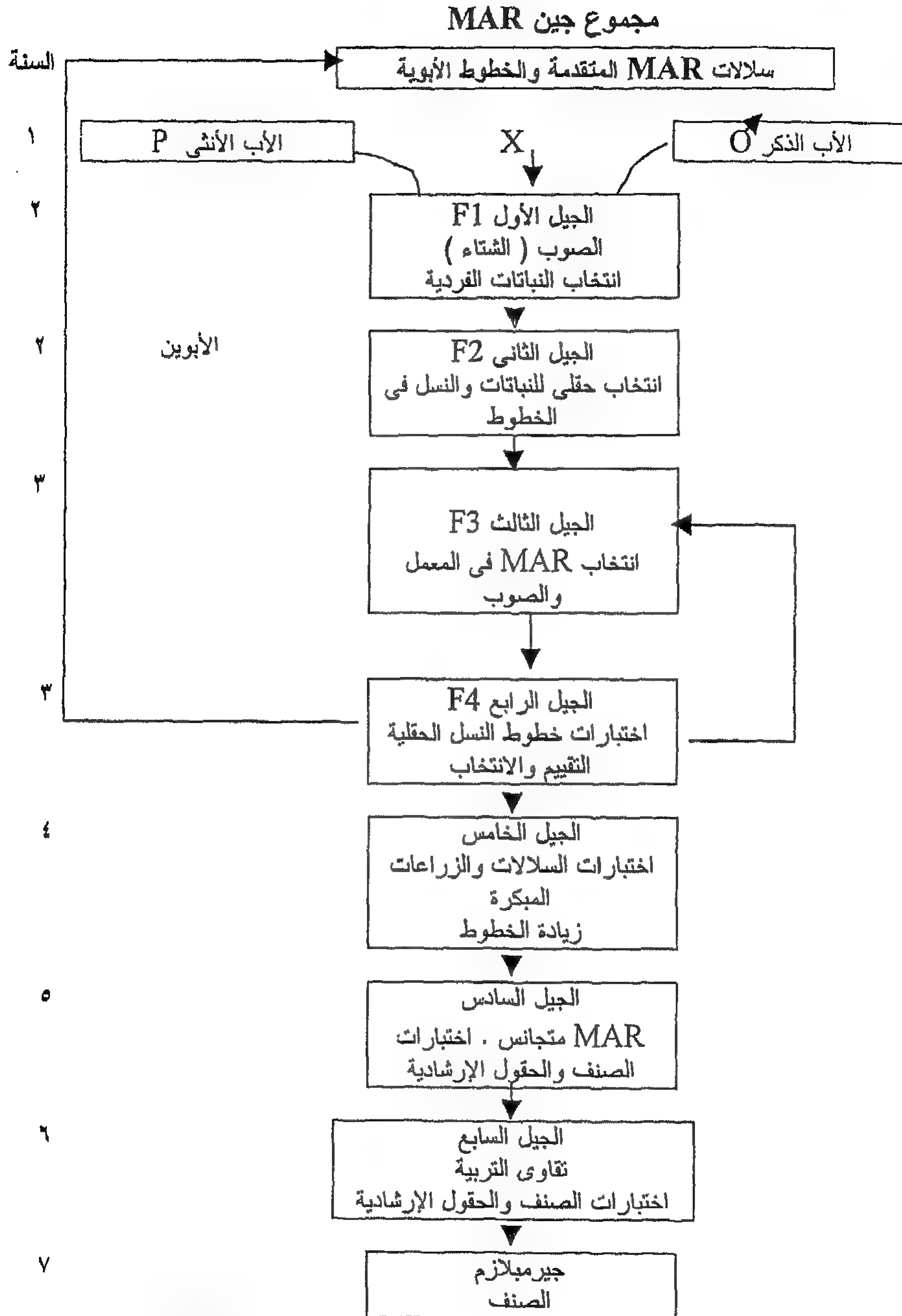
يتم زراعة التقاوى من انتخابات MAR من المعامل والصوب فى خطوط فردية فى الحقل فى الربيع من نفس السنة (٢٠٠٠ خط خلفة) . يجرى التقييم الحقلى فى نواحى نمو البادرات والمقاومة للفحة البكتيرية والمقاومة للحشرات ونظام الاثمار ونوع النبات . لقد أجرى الانتخاب لصفات عديدة ذات أهمية زراعية مثل تقارب الثمار وسلاميات قصيرة ومسك كبير للوز والإنتاجية والتبكير وجودة الألياف والبذور . التقاوى الناتجة من نسل الجيل الرابع المنتجة (٥٠-٦٠ سلالة) مناسبة لزراعة مشاتل MAR وزيادة خطوط الموسم التالى . نظام التقييم الحقلى MAR ذات أربعة مراحل (الشكل ٦-١) . السلالات الجديدة تزرع فى عشرة مشاتل فى تكساس (اختبار السلالة) لتقييم أداء السلالات تحت الضغوط

المكثفة من الحشرات والأمراض والبيئة . السلالات التى تثبت أداء مبشر وجيد تقيم فى اختبار حقلى مبكر فى تكرارات كثيرة فى خمسة مناطق . فى السنة التالية تتم زراعة أفضل السلالات من الاختبارات السابقة وتزرع تحت الاختبار المتجانس MAR فى ثمانية مواقع . السلالات الجيدة من هذه المجموعة تدخل فى اختبارات الصنف فى حقول المزارعين . بعد أن تثبت السلالة أداء ممتاز من جميع الصفات النباتية والمقاومة يتم اكثارها كتقاوى وتنشر كصنف MAR Tamcot (الشكل ٦-١) .

المكاسب الوراثية وأداء جيرمبلازم MAR

لقد بدأ تنفيذ برنامج MAR منذ عام ١٩٦٣ وأدخل فى التقييم ستة مجموعات من الجينات حيث استخدمت خطوات الانتخاب للحصول على مقاومة متعددة للعديد من العوامل المعاكسة MAR لإجراء الانتخابات مع كل مجموعة . لقد تم عمل المجموعات الجينية من خلال العبور بين خطوط التربية الأبوية والسلالات المتقدمة MAR لتحقيق الاختلافات الوراثية متبوعا بالتقييم والانتخاب . المجموعات الجينية المتتابعة أخذت أسماء كودية من MAR1 وحتى MAR6 . لقد تحقق تقدم حيث أن كل مجموعة جينية جديدة أعطت مستويات عالية من المقاومة للظروف المعاكسة المتعددة بالإضافة الى الإنتاجية العالية والصفات النباتية المتميزة عما هو الحال مع الأصناف العادية . التقدم الذى تحقق من برنامج MAR والظروف المعاكسة التى أمكن تحقيق مقاومتها موجودة فى الشكل (٦-١). اكثر من ٢٦٠ خط تربية وسلالة متميزة وعشرة أصناف قطن نزلت الى الأسواق .

إنجازات المجموعة الجينية MAR1 تمثلت فى هروب البادرات من المرض ، تحمل البذور والبادرات للبرودة ، الحفاظ على جودة التقاوى ، المقاومة للممرضات التى تسبب اللفحة البكتيرية ، المقاومة للذبول الفيوزاريومى والفيرتيسيليومى والنيماتودا ، الإنتاجية المحصولية العالية ، التبكير فى النضج . المجموعة الأولى MAR1 أسفرت عن ثلاثة أصناف تجارية تامكوتس Sp21 , Sp23 , Sp37 . المجموعة الجينية MAR2 حققت انجازات المقاومة لدودة اللوز الأمريكية والنطاطات البرغوثية وسوس اللوز وبكتريا تعفن الجذور والمقاومة لأمراض البادرات والضغوط المائية . ظهرت الأصناف التجارية من هذه المجموعة MAR2 هى Sp215 , Sp37H , cAMD-E . المجموعة الجينية الثالثة MAR-3 أدت الى الحصول على قاعدة وراثية عريضة أدت الى تحسين طول التيلة وزيادة المتانة علاوة على المقاومة لصدأ القطن . تميزت أصناف هذه المجموعة مقاومة للظروف المتعاكسة المتعددة وتحسين صفات التيلة . المجموعة الرابعة MAR-4 أظهرت مقاومة للعنكبوت الأحمر وبعض النباتات والتربس والمنّ وتبقعات الأوراق كما زادت



شكل (٦-١) : نظام تربية القطن للحصول على مقاومة للظروف المعاكسة (MAR) . طرق MAR التى تتضمن اختبارات التفرقة فى المعامل والصوب التى يتبعها بأربعة مراحل اختبارات فى عشرة مواقع خلال ولاية تكساس .

العزلات الجديدة من ممرض اللفحة البكتيرية من أفريقيا . الصنف الأملس الجديد MAR المسمى تامكوت CAB-CS مع عشرة خطوط قطن متميزة نزلت الى الأسواق عام ١٩٨٤ من خلال هذا البرنامج الرابع . فى عام ١٩٨٦ تم نشر الصنف GCNG , CD3H (عديم الغدد) من مجموعة الجينات هذه (الشكل ٦-٢) .

مجاميع جينات التربية MAR

	MAR1	MAR2	MAR3	MAR4	MAR5	MAR6	
١٩٩٣						أساس وراثى عريض	١٩٩٣
١٩٨٦		تحمل النطاطات ومقاومة	أساس وراثى واسع جودة الياف	مقاومة لبعض النباتات والتربس والمن والعنكبوت	جينات عديدة وهرمية لـMAR والمقاومة	زيادة طول ومتانة الألياف	١٩٨٦
١٩٧٨	الحفاظ على التقاوى	دودة اللوز الأمريكية	مقاومة للصدأ		جودة أليلف ضغوط المياه	مقاومة للحشرات والجفاف	١٩٧٨
١٩٧٢	تحمل البذور والبادرات للبرودة	وسوسة اللوز وعفن الجذور	مقاومة للفحة البكتريا	وتبقع الأوراق الذبول البكتيرى اللفحة البكتيرية HV-SU			١٩٧٢
١٩٦٧	تحمل بكتريا اللفحة	مقاومة أمراض البادرات والضغوط البيئية	R-18				١٩٦٧
١٩٦٣	تحمل الذبول الفيوزاريومى والفرتسيليوم تحمل النيماتودا التبكير الإنتاجية R-17						١٩٦٣
	← خطوط التربية →						
	SP21 تامكوت Sp23تامكوت Sp37 تامكوت	Sp21S Sp37H		CAB-CS CD3H GCUH	HQ95	Tamcot II	

شكل (٦-٢) : التقدم الذى تحقق فى برنامج MAR مع مجاميع الجينات المسئولة عن مقاومة الظروف المعاكسة المتعددة

المجموعتان الجينية الخامسة MAR-5 والسادسة MAR-6 أدت للحصول على أصناف ذات مقاومة عالية لكل الممرضات النباتية والحشرات والضغوط غير الحيوية (الشكل ٦-٢) . فى المجموعة MAR-6 تم تكثيف الجينات أكثر لتحقيق قاعدة وراثية عريضة للمقاومة ضد الآفات والضغوط البيئية والجفاف بالإضافة الى المحصول العالى وتحسين جودة الألياف والتقاوى . تم النشر التجارى للصنف HQ95 وثمانية خطوط تربية متميزة من MAR-5 . لقد تم إدخال بعض الصفات المورفولوجية فى هذه الخطوط مثل الأصناف الملساء وعديمة الغدد والخالية من الرحيق والأوراق بشكل الباميا واللون الأحمر للنباتات .

المقاومة للممرضات النباتية

تقاوى القطن التى عندها مقدرة وراثية على الإنبات ومقاومة أمراض البذور والبادرات وإنتاج بادرات صحية عندما تزرع مبكرا فى الموسم تحت ظروف باردة ضرورية لتحقيق إنتاج عالى من القطن . قدرة البذور والبادرات على النمو فى تربة باردة مع أقل ضرر من فطريات التربة تمثل مفتاح برنامج التربية MAR بصفاته المتميزة ناحية مقاومة العديد من الظروف البيئية المعاكسة . الجيرمبلازم MAR-1 حساس لأمراض البادرات ولكنه مقاوم جزئيا لتدهور البذور ، الجيرمبلازم MAR-2 , MAR-4 ذات مقاومة متوسطة بينما الجيرمبلازم MAR-5 , MAR-6 كانت مقاومة (جدول ٦-٢) . بوجه عام وجد أن مستويات المقاومة للآفات والضغوط الأخرى فى الصنف أو الجيرمبلازم MAR-3 (١٩٨٠ – ١٩٨١) كانت تتوسط بين MAR-2 , MAR-4 . لقد أشار Wallace ، (١٩٨٥) ، Poswal (١٩٨٦) ، Hernandez ، (١٩٨٧) الى حدوث تقدم فى تحسين سبل تحقيق المقاومة لممرضات التقاوى والبادرات ونمو النباتات . لقد نجح البرنامج MAR فى تحقيق مستويات عالية من المقاومة فى جيرمبلازم القطن لكل السلالات الأمريكية التسعة عشر من مسبب الذبول البكتيرى .

مع اضطراد التقدم فى اتجاه المقاومة لممرضات الذبول الوعائى وعفن الجذور والنيماتودا ولو أنه لا يوجد انتخاب مباشر ضد هذه الآفات . لقد كان معدل المكاسب الوراثية الخاصة بالمقاومة لهذه الممرضات كان أبطأ من معدل المكاسب فى الأربعة صفات الأخرى والتى يجرى لها انتخاب مباشر . المجموعة الجينية MAR-1 للجيرمبلازم ذات مقاومة متوسطة للذبول الفيوزاريومى ونيماتودا تعقد الجذور بينما كانت السلالات من MAR-2 وحتى MAR-6 مقاومة (جدول ٦-٢) . السلالات الجديدة MAR-6 ذات مستويات عالية من المقاومة لذبول الفيرتيسيليوم عن MAR-1 (مقاومة جزئية) وكانت

سلالات MAR-2 - MAR-6 ذات مقاومة متوسطة . من أكـــثر الإنجـــازات ارتبـــاط المحصول العالى بخفض عفن جذور القطـــن للســـلالات MAR-5 , MAR-6 (الزيـــك وآخرون ، ١٩٨٨ وكذلك الباحث ساكستون وآخرون ، ١٩٩١) . لقد أمكن تحقيق مقاومـــة للممرض P.Omnivorum فى كل مجموعة جينية من خلال برنامج MAR .

جدول (٦-٢) : مستويات المقاومة للظروف المعاكسة المتعددة فى المجموعـــات الجينيـــة MAR

الظروف المعاكسة	مستوى المقاومة *				
	MAR-1 ١٩٦٧-٦٨	MAR-2 ١٩٧٧-٧٨	MAR-4 ١٩٨٤-٨٥	MAR-5 ١٩٨٧-٨٨	MAR-6 ١٩٩٠-٩٤
* الممرضات النباتية التى تسبب					
– تدهور البذور	PR	IR	IR/R	R	R
– أمراض النبات	S	IR	IR/R	R	R
– اللفحة البكتيرية	HR	HR	HR	HR	HR
– معقد الذبـــول الفيوزاريومـــى ونيماتودا تعقد الجذور	R	R	R	R	R
– ذبول الفيرتيسيليوم	PR	IR	IR	R	R
– عفن جذور الفيماتوتريكوم	HS	PR	IR	IR	IR
– تبقع الأوراق	S	PR	IR	R	R
* الحشرات					
– التربس	S	PR	IR	R	R
– نطاطات القطن البرغوثية	HS	PR/IR	IR	R	R
– بق الليجس	HS	S/PR	PR	IR	IR/R
– ديدان اللوز	HS	IR	R	R	R
– دودة براعم الدخان	HS	IR	IR/R	IR/R	R
– سوسة اللوز	S	PR/IR	IR/R	R	R
* العنكبوت الأحمر	S	S	PR	IR	IR/R
* الضغوط البيئية					
– البرد والبذور والبادرات	PR	IR	R	R	R
– ضغط الرطوبة	S	PR	IR/R	R	R

* IM = منيع   HR = مقاومة عالية   R = مقاومة   IR = مقاومة متوسطة
PR = مقاومة جزئية   S = حساسة   HS = عالى الحساسية

المقاومة للحشرات

الهدف الأولى لبرنامج MAR يضطلع بالأمراض النباتية ولو أنــه يمكــن تحقيــق بعض المكاسب فى اتجاه تحقيق المقاومة للحشرات . الجيرمبلازم MAR-1 وجد حساســا لمعظم الحشرات . لقد أمكن الحصول على مقاومة جزئية ومتوسطة لبعض الحشرات فـــى الجيرمبلازم MR-2 , MR-4 (جدول ٦-٢) . فى الجيرمبلازم MR-5 , MR-6 زادت مستويات المقاومة حتى مستويات المقاومة المتوسطة والفعلية . لقد قـــدم البـــاحث Bird ، (١٩٧٩) الدليل على أن الصنف Pamcot cAMD-E وهو جـــيرمبلازم MAR-2 ذات مقاومة متوسطة لحشرة سوسة اللوز وبعد ذلك أثبت Zummo وآخرون أنه مقاوم لديـــدان اللوز الأمريكية كذلك وجد أنه الصنف الأول الأبلاند ذات المقاومة العالية لخمسة ممرضات نباتية وثلاثة حشرات . الصنف Tancot HQ95 مـــن MAR-5 ذات مقاومـــة عاليـــة للحشرات والاجهاد المائى وكذلك ستة ممرضات حشرية وأربعة أنواع من الحشرات . تـــم تحقيق سلالات جديدة من MAR-5 , MAR-6 ذات مستويات مقاومة عالية لحشرات أول وآخر الموسم (الزيك وآخرون ، ١٩٨٨) .

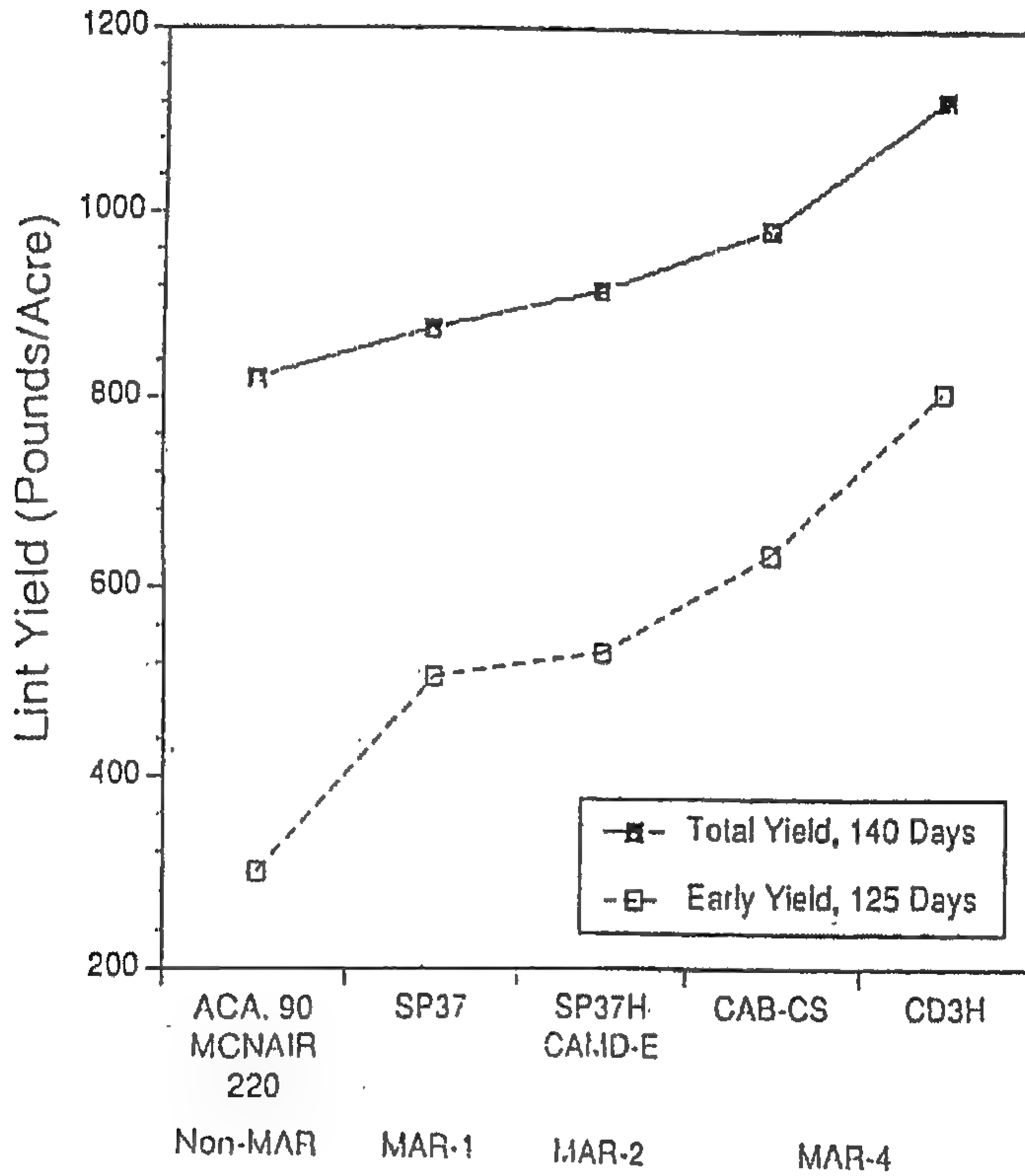
تحمل الجفاف Drought tolerance

الاجهاد المائى من اكثر العوامل المعاكسة تأثيرا على الإنتـــاج الثمـــري وتســاقط البراعم واللوز وإنتاج الشعر وجودة ألياف القطن . لقد تـــأكد الاختـــلاف بيـــن أصنـــاف وسلالات القطن بشكل كبير فى استجابتها للاجهاد المائى فى منتصف الموسم . لقـــد وجـــد كوك والزيك (١٩٩٣) اختلافات وراثية بين مصادر جـــيرمبلازم القطـــن الموجـــودة فـــى الأسواق الأمريكية بما يؤثر على إنتاج الأزهار واللوز والشعر والتبكير وكفاءة الاستفادة من الماء . لقد تم تحديد أن السلالة (HAR-4) Tamcot CD3H كصنف متحمل للجفاف مع كفاءة عالية لاستخدام الماء والإنتاج العالى من الأزهار والتى تلعب دورا كبيرا فى تحمـــل الجفاف بالمقارنة بالأصناف الأخرى التى شملتها الدراسة . الانتخاب الذى يؤدى الى نمـــو جيد للبادرات وسرعة نمو المجموع الجذرى والنسبة المنخفضة بين المجموع الجذرى الـــى المجموع الخضرى فى الجيرمبلازم المستقبلية فى القطن سوف تحسن من تحقيـــق صفـــة تحمل الجفاف وإنتاجية المحصول فى المناطق التى تعانى من مصادر مائيـــة محـــدودة أو توزيع فقير للأمطار .

محصول الشعير Lint yield

الهدف الأساسى لتحسين وراثية القطن من خلال البرامج المعينة تتمثل فى تطويـــر الأصناف ذات الإنتاجية العالية مع جودة فائقة للألياف والبذور . إدخال مستويات عالية مـــن

المقاومة للآفات والاجهادات غير الحيوية فى الأصناف عالية الإنتاج تعتبر من التحديـــات الكبيرة . لقد تم توثيق الأداء المتميز الفائق للجيرمبلازم المقاوم للظروف المعاكسة المتعـددة والأصناف المتميزة (Bird ، ١٩٧٥ ، ١٩٨٢ والزيك وآخرون ، ١٩٨٨ ...) أظـــهرت البيانات التى جمعت على مدى ٣٠ عاما أن أصناف MAR ذات إنتاجية عالية فى وجـــود أو غياب الظروف المعاكسة . جيرمبلازم MAR ذات ميزة متميزة فى الإثمـــار المبكـــر ونضج المحصول . سأكتفى بالشكل (٦-٣) فى هذا المقام والذى يوضح الاختلافـات فـــى إنتاجية الشعر مع الأصناف المختلفة المتحملة للظروف المعاكسة المتعددة .



تجمع جينات MAR والأصناف

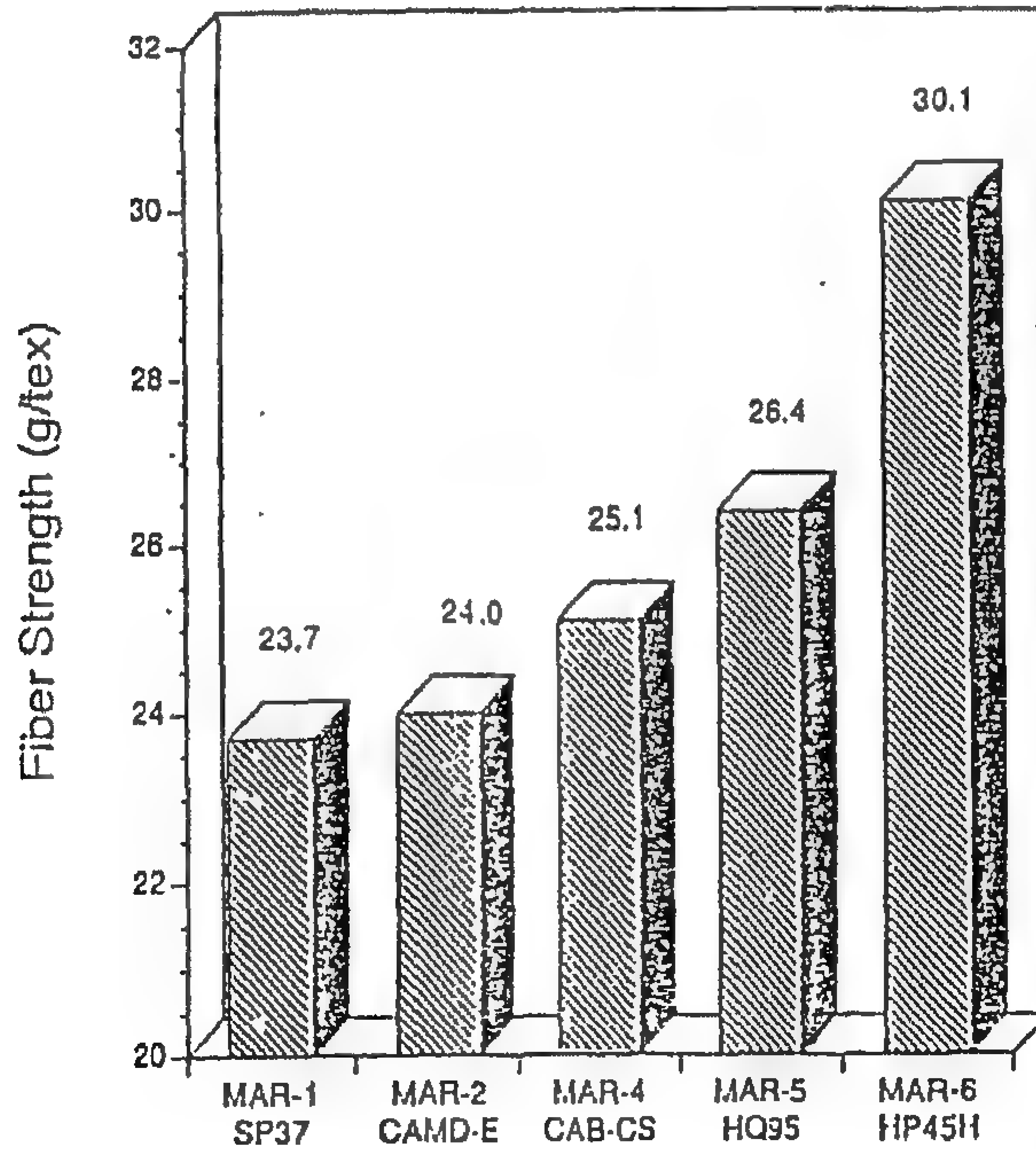
شكل (٦-٣) : متوسط المحصول (الجمعة الأولى) ومحصول الشعير الكلى لأصناف القطـــن MAR وعديمة MAR . البيانات من تجارب فى أربعة بلدان فى الحزام الشرقى فـــى تكســاس خلال ثلاثة سنوات (١٩٨٤ - ١٩٨٦) .

التبكير Earliness

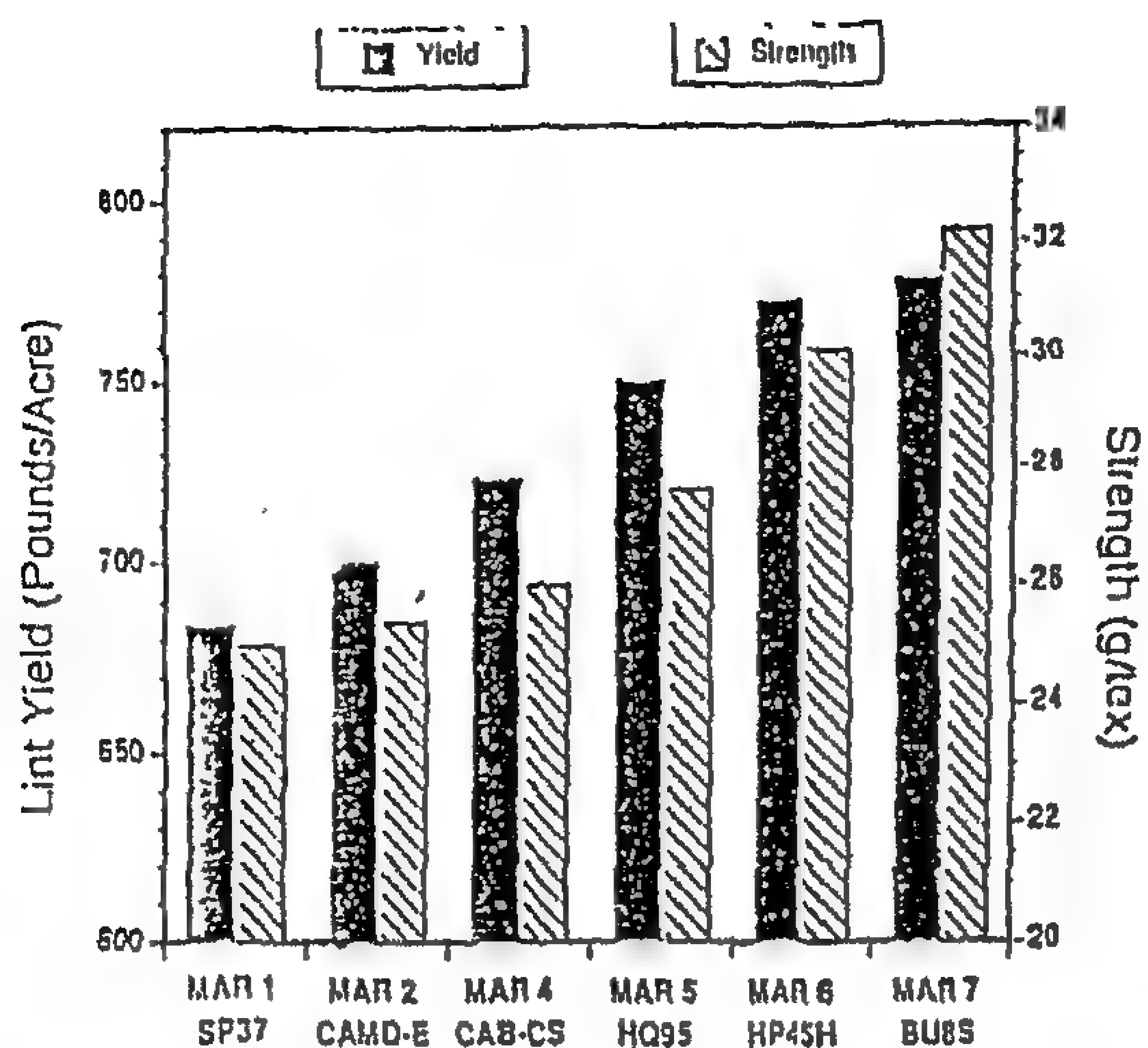
منذ السبعينيات وبرامج التربية تستهدف وتتطلع الى تحقيق النضج المبكـــر . لقـد زادت النسبة المئوية للأصناف مبكرة النضج فى جنوب وسط أمريكا بمقــدار ١١% عــام ١٩٧٨ ووصلت الى ٩٠% عام ١٩٨٦ (بريدج وماكدونالد ، ١٩٨٧) . المساحات التـــى زرعت من هذه الأصناف فى مناطق زراعة القطن فى الجنوب الشرقى وغـــرب أمريكـا كانت زيادتها طفيفة فى نفس الفترة .

جودة الشعر Fiber quality

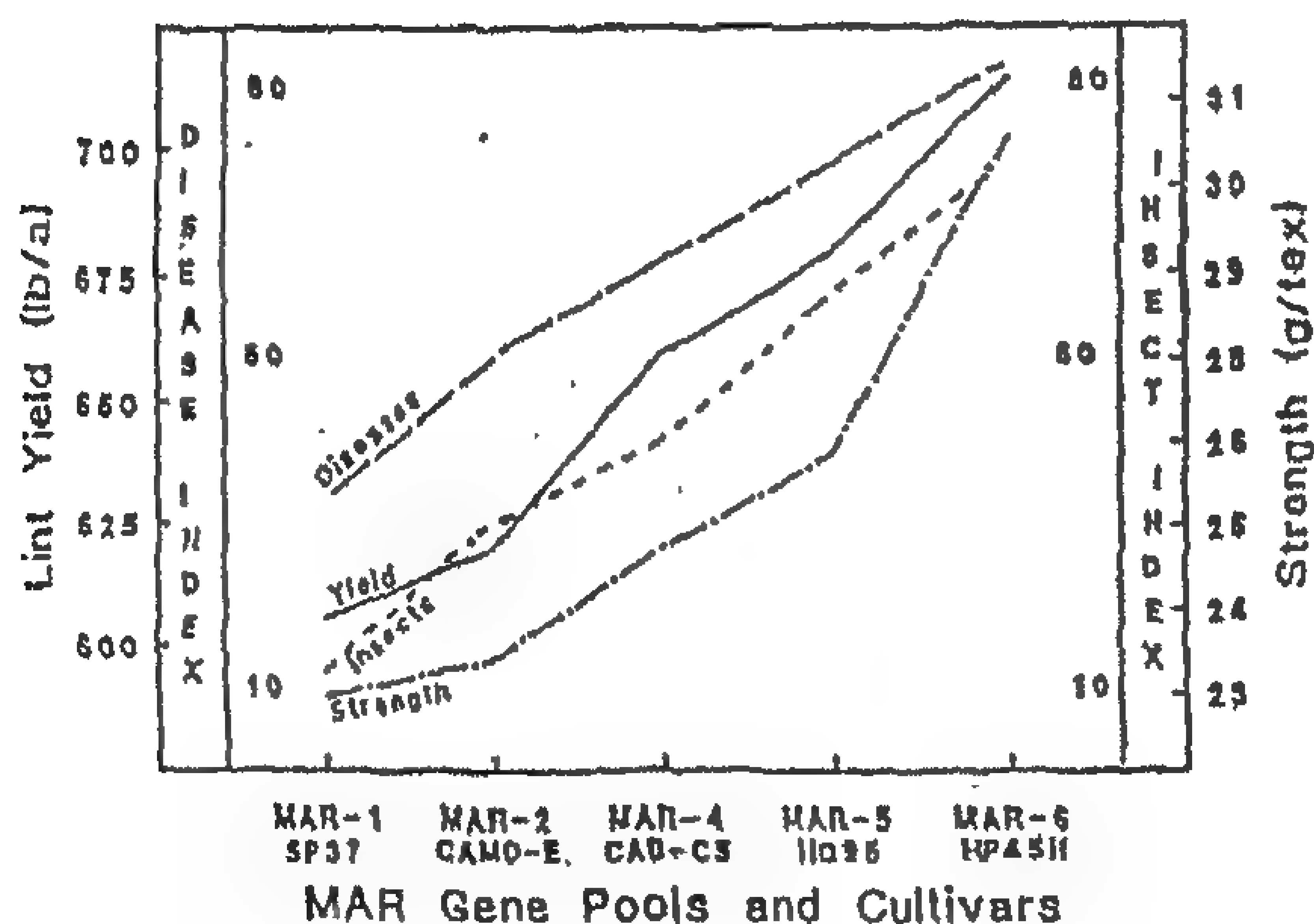
بوجه عام وجد أنه مع زيادة الإنتاجية من الســلالات MAR-1 وحتـــى MAR-6 شكل (٦-٤) يحدث تحسن فى جودة الألياف . من الجيرمبلازم MAR-6 تــراوح طــول الألياف ١,١ حتى ١,٢١ بوصة والتجانس من ٨٣ الى ٨٨,٢ والشـــدة ٢٧,٦ الـــى ٣٠,١ جرام / tex والطول من ٥,٨ الى ٧,١ ومدى الميكرنير مـــن ٣,٧ الــى ٤,٦ . ســأكتفى بالأشكال (٦-٥) ، (٦-٦) كى أوضح للقارىء الكريم مدى التقدم الذى تحقق فى إنتاجيـــة وجودة الألياف والمقاومة للأمراض النباتية والحشرات .



شكل (٦-٤) : متوسط شدة الألياف لأصناف الثامكوت التى تمثل مجموعة MAR1 وحتـــى MAR-6 خلال ستة أعوام مع ٣٥ اختبار .



شكل (٦-٥) : متوسط محصول الشعر وشدة ألياف أصناف تسامكوت من MAR1 حتى MAR-7 (مجموع وراثى) على امتداد سنتان .



شكل (٦-٦) : التحسن المضطرد فى إنتاجية الشعر وشدته والمقاومة للممرضات النباتية والحشرات من MAR-1 وحتى MAR-6 (تجمع وراثى) . دلائل الأمراض والحشرات تمثل متوسط مستويات المقاومة لستة ممرضات وأربعة حشرات .

تأثير ومردود جيرميلازم MAR

استخدام نظام التربية لتحقق مقاومة للظروف المعاكسة المتعددة MAR ثبتت فعاليتها الكبيرة والنجاحات فى تطوير الحصول على جيرمبلازم متميز للقطن وإيجاد أصناف لا تحدث أخطار محسوسة على المزارعين مع تقليل تكاليف الإنتاج وزيادة العائدات . لقد أسفر هذا البرنامج الضخم عن نزول عشرة أصناف تامكوت للأسواق مع أكثر من ٢٦٠ خط تربية MAR . لقد نجح مربى النباتات وشركات التقاوى التجارية فى إدخال ٢٣ صنف قطن من برنامج جيرمبلازم MAR . فى السنوات الخمس الأخيرة تمت زراعة ٥٠% من مساحات القطن بأصناف جيرمبلازم MAR والتامكوت فى ولايات تكساس وأوكلاهما . هذه تمثل من ٣-٤ مليون أكر أو ٢٥% من جملة مساحة القطن فى أمريكا . إن تقريب الفجوة بين الإنتاج الفعلى والمستهدف يرجع الى تحقيق المقاومة النباتية للآفات والضغط والإجهاد فى برنامج جيرمبلازم MAR .

تقنيات المقاومة Mechanisms of Resistance

لقد تم تعريف أصناف القطن ذات مستويات المقاومة المختلفة للعديد من الممرضات النباتية والنيماتودا والحشرات والأكاروسات والاجهادات البيئية . الدفاعات النباتية والتقنيات ذات القيمة المعروفة فى تربية النباتات المقاومة للآفات تقع فى أربعة مجاميع :

١-الفسيولوجى والحيوية .

٢-الميكروبيولوجية .

٣-المورفولوجية او الطبيعية .

٤-الفينولوجية .

العائل النباتى ينتج كيميائيات طاردة وجاذبة للحشرات . نواتج التمثيل الثانوية من النبات العائل ومورفولوجية النبات العائل وتركيبه التشريحى والحالة الغذائية والمجموع الميكروبى النافع ومعدلات النمو كلها عوامل تساهم فى تحقيق المقاومة . المقاومة التى ترجع الى الصفات المورفولوجية أو الطبيعية أو التركيبية تتداخل مع تقنيات الانتخاب فى العائل والتغذية وتكوين المستعمرات والتناول والهضم والتزاوج أو وضع البيض فى الآفات. لون النبات وشكل والتحور التشريحى للأعضاء كما فى الأوراق شكل البامية والأشواك والشموع السطحية وتصلب الأنسجة وخليط هذه الصفات تعمل كمواد طاردة أو حواجز للآفات .

التضاد الحيوى تمثل أهم مسارات كيفية احداث المقاومة للآفات . التضاد الحيوى يسبب نقص فى مجموع الآفة بسبب موت الآفة أو نقص معدل التطور أو خفض الكفاءة التناسلية . بعض المضادات الحيوية ترتبط بأنسجة النباتات السليمة الصحية أو تحفز مع حدوث الجروح . هناك مضادات حيوية أخرى تخلق فى الخلايا النباتية بعد الإصابة والهياج من الحشرات أو مسببات الأمراض النباتية ويطلق عليها الفيتوالكسينات (Bell ، ١٩٨٦ ، Bell وآخرون ، ١٩٩٣) . عادة تكون العوامل البيوكيميائية أكثر أهمية عن الاختلافات فى المورفولوجية فى تحديد مستوى التضاد الحيوى للآفة الحشرية . نواتج التمثيل الثانوى فى العائل النباتى تسبب معظم التضاد الحيوى .

التقنيات البيوكيميائية والفسيولوجية

العديد من نواتج التمثيل الثانوية تشترك فى مقاومة العائل النباتى . العديد يحقق مقاومة لمختلف الحشرات والأكاروسات ومسببات الأمراض النباتية . هذه المركبات يبدو أنها تعمل كمبيدات فطرية أو حشرية أو فيروسية أو بكتيرية وسموم للحيوانات الراقية . المركبات الثانوية تعمل كجاذبات أو منشطات للتغذية فى الحشرات ومثبطات للتعذر . المواد البيوكيميائية التى تشترك فى إحداث المقاومة للحشرات ومسببات الأمراض فى القطن تم حصرها (Bell ، ١٩٨١ ، ١٩٨٦ وكذلك Bell and Stipenovic ، ١٩٧٨). لقد تم حصر قسمان من نواتج التمثيل الثانوى وهى الالدهيدات التربينية (جوسيبول) والفلافونات (التانينات الكثيفة) حيث تعتبر من المصادر الهامة لمقاومة الحشرات فى نباتات القطن كما هو مذكور فى المراجع . لقد أشار العديد من البحاث الى وجود اختلافات فى تركيز المواد البيوكيمائية بين أصناف القطن . بالإضافة الى ذلك فقد لوحظت اختلافات بين المواسم وداخل الموسم الواحد فى نوعية وكميات المواد الكيميائية الفعالة "الالليلوكيميائيات"

لقد وجد Thaxton وآخرون ، ١٩٨٨ اختلافات فى تركيزات التانين فى أوراق القطن فى الأصناف المختلفة تتراوح من ٠,٢١٨% وحتى ٠,٣٨٦% (الوزن الطازج) . لقد اتضح أن الأصناف العادية التى لا تقاوم الظروف المعاكسة (non-MAR) مثل اللانكارت ٥٧ ، لوكيت ٤٧٨٩-أ تحتوى على أقل تركيزات من التانين . لقد وجد ان تركيزات التانين فى السلالات MAR وأصناف التامكوت تزداد بعلاقة خطية مع تقدم الزيادة فى مستويات المقاومة للحشرات ومسببات الأمراض النباتية من المجموع الوراثى الجينى من MAR-1 وحتى MAR-4 . لذلك فان التحسين الوراثى MAR قد يؤدى الى الانتخاب غير المباشر للمستويات المتزايدة من التانينات المكثفة فى الأوراق (Thaxton وآخرون ، ١٩٨٨) . فى نفس الدراسة وجد ان الزيادة فى تركيزات الجوسيبول فى تبلات الأزهار فى مجموع جينات MAR لا تتواكب مع المكاسب التى تحققت مع المقاومة للآفات خاصة الحشرات .

لقد أوضح Bird ، (١٩٨٢) أن اخراجات أغلفة البذور وجذور النباتات المقاومة للظروف المعاكسة MAR قد تكون ذات تأثير منشط على الكائنات الدقيقة النافعة (بكتريا – اكيتنومايسيتس) ومن ثم يكون ذات تأثير غير ملائم على الممرضات النباتية . مكونات الرواشح قد تلائم تطور البكتريا والاكتينومايسيتس النافعة فى منطقة الريزوسفير وما فوقها وبذلك تقلل من قابلية العنف للإصابة بمسببات الأمراض النباتية التى تصيب الجذور . التوازن بين العناصر المغذية الكبرى والصغرى تقلل من الضغوط على النباتات والحساسية للآفات . قد تختلف الطرز الوراثية بشكل معنوى فى استجابتها للضغوط وتركيزات العناصر المغذية الضرورية . العناصر الغذائية قد تؤثر على شدة الإصابة بالمرض والحشرات عن طريق تغيير مقاومة العائل للآفة وتغيير مقدرة العدوى وعنف الممرضات وديناميكية المجموع والتفضيل العوائلى للحشرات . كذلك تؤثر المغذيات على الكائنات النافعة في مستوى الجذور والساق .

المقاومة الميكروبيولوجية

لقد افترض Bird ، (١٩٨٢) أن الكائنات النافعة تعيش كجزء من الفلورا الداخلية والخارجية العادية فى نباتات القطن . تلعب هذه الكائنات الدقيقة دورا رئيسيا فى المقاومة للممرضات النباتية والحشرات . الأقطان التى تتحمل الظروف القاسية المتعددة MAR تأوى مجاميع عالية من البكتريا النافعة عن الطرز الوراثية العادية . لقد تم عزل البكتريا من الصنف تامكوت CAMD-E وعرفت على أنها باسيلليس تنشط بشكل واسع المقاومة النباتية للآفات . لقد أظهرت الأبحاث أن معاملة الأقطان الحساسة بأنواع الباسيلليس تجعلها مقاومة لمسبب اللفحة البكتيرية وممرضات التقاوى وأعفان الجذور وكذلك سوسة اللوز . لقد أفادت هذه النتائج فى زيادة كفاءة تعريف تقنيات المقاومة فى النبات العائل . لقد أوضحت النتائج الأولية كذلك أن الكم والكيف للفلورا الدقيقة النافعة تحت تحكم وسيطرة وراثية للنبات (EL-Zik and Thaxiton تحت النشر) .

الصفات المورفولوجية Morphological traits

لقد تم تعريف عدد من الصفات النباتية الخارجية (المورفولوجية) المرتبطة بمقاومة العائل النباتى للحشرات والعناكب والأكاروسات وكذلك الممرضات النباتية خاصة فى نباتات القطن (جدول ٦-٣) . لا يوجد عامل أو صفة واحدة مسئولة عن المقاومة المناسبة لكل الافات . قد تحدث تأثيرات متباينة أو متعاكسة لهذه الصفات على الحشرات المختلفة . الكثير من هذه الإختلافات فى الإستجابة ترتبط بالخلفية الوراثية لسلالات القطن. لقد نشر أن المقاومة للحشرات ترتبط بالعديد من الصفات الوراثية المورفولوجية مثل الورقة

بشكل ثمرة الباميا والفريجوبراكت وخلو الرحيق ، الشعر الكثيف (Pilose) والأملس glabrous ولون النبات الأحمر . من الصفات النباتية الأخرى التى ذكر أنها تؤثر على الإصابة بالحشرات مثل النضج المبكر والهروب من الإصابة والعامل × وعامل خفض وضع بيض سوسة اللوز (OSF) وعامل خفض البق النباتى . لقد نجح مربى النباتات فى نقل ودمج العديد من الصفات المورفولوجية فى بنوك التربية وبعضها كان متوفرا فى الأصناف المحورة .

فينولوجى النبات (النمو) والنضج المبكر Plantphenology

النمو والتطور الموسمى والتبكير فى ظهور وتكوين ثمار القطن وتبكير النضج تؤثر على مقاومة القطن لسوسة اللوز ودودة اللوز الأمريكية ودودة اللوز القرنفلية . لقد تأكد أن تحقيق هروب النباتات من الإصابة من خلال زراعة الطرز الوراثية قصيرة الموسم والنظم الزراعية يحقق خفض كبير فى الضرر بحشرات آخر الموسم فى بعض المناطق داخل حزام القطن (EL-Zik and Frisbie ، ١٩٨٥) . استخدام هذا الاقتراب مع العمليات الزراعية المناسبة مع الأصناف مبكرة النضج قد تمنع تطور دودة اللوز القرنفلية فى البيات الشتوى ونفس الشيء مع دودة اللوز الأمريكية ومن ثم تسمح بالتخلص المبكر من المخلفات النباتية وهذا يقلل بالتالى من مجموع الآفات التى تمضى الشتاء فى هذه المخلفات . لقد أتفق على أن الأصناف مبكرة الاثمار وتلك ذات الصفات المورفولوجية الخاصة والمتميزة تعتبر نظام مصيدة نباتية trap-crop system فى مكافحة الحشرات . هذا ما نقوم به الآن فى كلية الزراعة جامعة عين شمس فى وحدة بحوث السمية البيئية بالتعاون مع الفريق البحثى بجامعة ميرلاند كلويج بارك فى أمريكا فى تحديد الصفات المورفولوجية فى نباتات الذرة والفراولة والفول المرتبطة بالإنتاجية والمقاومة للآفات .

التكنولوجيا الحيوية Biotechnology

بالرغم من النجاحات التى تحققت فى برامج التربية فانه مازالت هناك حاجة لتحقيق مكاسب فى الإنتاجية والجودة والمقاومة للآفات . يقدم اقتراب البيولوجيا الجزيئية فرصا لتحفيز مجهوداتنا فى تطوير الحصول على الأقطان الجديدة مع مستويات عالية من المقاومة للآفات العديدة وغيرها من الصفات الهامة . هناك أربعة مكونات من التكنولوجيا الحيوية . الخرائط الجينومية وهى التى تساعد كلا معلم الدنا – مساعد الانتخاب ، خريطة أساسية لكلونة الجين ، البصمة الوراثية لأصناف القطن . التحول الجينى يكون متاح كوسيلة فى إدخال الجينات المقاومة للآفات ومبيدات الحشائش من أجناس أخرى وعائلات أخرى أو حتى ممالك أخرى . تجديد الخلايا المتحولة من خلال التطور الجينينى الجسمى أو أية

وسائل أخرى واجبة الحدوث لشفاء الخلايا المتحولة وراثيا ونفس الحال مع النباتات المتحولة وراثيا . فى القطن يكون التطور الجينينى الجسمى متخصص بالنسبة للصنف ومن الصعوبة الحصول على نباتات مع الجينات المغروسة فيما عدا الأصناف كوكر ٣١٠ ، ٣٦٢ . النباتات المتحولة وراثيا يجب أن تحمل الجين أو الجينات المغروسة بالإضافة الى العديد من الجينات التى تتحكم فى الإنتاجية والجودة والمقدرة على التكيف . تكنولوجيا التحول تشمل استخدام الأجروباكتيريوم توميفاسينس وموقع الجسيمات وحقن الدنا . توجد مزايا وعيوب لكل من هذه الطرق ..

جدول (٦-٣) : ملخص للصفات المرتبطة بالمقاومة النباتية فى القطن

الصفات	سوسة اللوز	الدودة الأمريكية	دودة اللوز	جاسيدز	بق ليجس	نطاط القطن	التربس	من القطن	نطاط كرنب	ناقبات	الذباب	العنكبوت	أعفان الجذور
عدم وجود رحيق	ع	م/؟	م	؟	م	م	ع	؟	ع	م	ع	ع	م
الأملس	ع	م	م	خ	؟	؟	ح	ح	ح	ع	م	ع	ع
هيروسوتوم١	ع	خ	ع	م	ع	ع	ع	ح/؟	ع	ع	ع	ع	ع
كثيف الشعر ٢	م	خ	خ	م	م	م	م	ح	م	م	ح	ع	ع
شكل الباميا	م	ع	م	ع	ع	ع	ع	؟	ع	؟	م	غ	م
فريجوبراكت	م	ع	ع	ع	ح	ح	ع	؟	ع	؟	ع	ع	م
نبات لونه أحمر	م	ع	ح	ع	ع	ع	ع	م	ع	ح	ع	ع	ع
مقاوم للدودة الأمريكية	ع	م	ع	ع	؟	؟	؟	؟	؟	؟	ع	ع	؟
جوسيبول عالى	ع	م	ع	م	م	م	ح	؟	ع	؟	ح	ع	؟
تانين عالى	ع	م	م	ع	؟	؟	؟	؟	؟	؟	؟	؟	؟

ع = عديم التأثير م = مقاوم ح = حساس ؟ أدلة متضاربة

فى السنوات الحديثة قدم اقتراب البيولوجيا الجزيئية وسائل مناسبة للتحليل السريع والتفصيلى للنواحى الوراثية للكائنات الراقية بما فيها الأنواع الزراعية . ربما يكون من أكثر أساسيات هذه الوسائل " معلمات الدنا DNA marker " والتى يمكن أن تستخدم للكشف عن الاختلافات فى المعلومات الوزاثية التى تحمل بواسطة اثنين أو أكثر من الأفراد. التطبيق السريع الواسع لمعلمات الدنا يتمثل فى وضع الخرائط الوراثية التى يمكن أن تستخدم لتقدير الموقع الكروموسومى للجينات والتى تؤثر على الصفات البسيطة أو

المعقدة (Paterson وآخرون ، ١٩٩١) . بالنظر لعمل واستغلال الخرائط الوراثية فان معلمات الدنا لا تختلف فى الأساس عن الأنواع الأخرى من المعلمات الوراثية والتى استخدمت منذ بداية التسعينيات ولكنها وجدت فى أعداد كبيرة . مع هذا العدد الكبير فى المعلمات الوراثية فانه يمكن عمل خريطة وراثية كاملة تعطى معلومات كاملة عن كل مناطق فى كل كروموسومات الكائن .

إن تطوير الخريطة الوراثية عالية التفاصيل للقطن من خلال استخدام المعلمات تقدم فرص جديدة لتوصيف الجيرمبلازم ودراسات التنوع والتحليل الكمى للصفات والانتخاب النباتى فى برامج تربية القطن . معرفة موضع خريطة الجين يمكن أن يستخدم بواسطة البعض كمعلمات الدنا لتشخيص وجود الجين دون الانتظار لحدوث التأثير أو التأثيرات الجينية . يمكن أن تستخدم المعلمات للحصول على معلومات أكثر عن الجينات التى تؤثر على العديد من الصفات الهامة بما يسهل ويعضد مجهودات التربية . هذا سوف يسهل كذلك تعريف الجينات التى تسيطر على وتتحكم فى الوظائف النباتية .

قرار تربية النبات يتضمن تعظيم المكاسب فى صفة واحدة مع تقليل الفقد فى الصفات الأخرى . الحاجة لتحقيق هذه المكاسب ذات الصبغة والأهمية التجارية تكون من جراء تتابعات الجينات المختلفة ذات الارتباط القريب أو جين منفرد يؤثر على صفات متعددة (Pleiotropy) . يمكن أن تستخدم الخرائط الوراثية فى تحديد ما إذا كان الارتباط بين الصفات المختلفة يرجع الى مواقع كمية للصفات Quantitative trait loci والتى يمكن أن تفصل بالدمج أو QTL منفرد مع تأثيرات عديدة غير متباعدة . المعلمات الوراثية تمثل الاختلافات الوراثية التى تسمح بتقدير الارتباط بين الطرز الجينية المختلفة ومن ثم التنبؤ بالتزاوجات التى تؤدى الى إنتاج خليط من الجينات الجديدة وذات الصفات الفائقة . عندما تتوفر معلمات للجينات محل الاهتمام يمكن الكشف عن الدمج بين هذه الجينات وتحقيق انتخاب دقيق للأفراد ذات الصفات الوراثية المتميزة من بين عدد كبير من مجاميع الانعزالات . مع تعريف المعلمات الدنا يمكن تشخيص الصفات المحددة والتى يمكن الاحتفاظ بها واستعادتها مع إضافة صفات جديدة للحصول على أصناف مهندسة وراثيا ذات صفات مرغوبة فائقة . الوسائل الجزيئية وغيرها من الطرق تقدم إمكانيات للاستفادة من مصادر الجيرمبلازم المتوفرة لفهم العديد من العمليات الأساسية التى تحدث فى النباتات .

لقد تم وضع خريطة تفصيلية للقطن RELp (التشكل المتعدد لشريحة الطول المحدود Restricted Fragment Length Polymorphism) (Reinisch وآخرون ١٩٩٤) . لقد تم عمل طريقة لأكثر من ٧٥٠ جين مرتبة فى ٤١ مجموعة مرتبطة . جينوم

القطن حوالى ٥٠٠ سنتمورجان فى الطول وهو المقياس الذى يعكس مستوى الدمــــج بيــن الكروموسومات وإمكانيات حدوث دمج جينى فى النسل العبورى . باستخدام معلمات الدنــــا يمكن من وصف موقع الصفة الكمى (QTL's) عن طريق موقع كروموســـوماتها وتـــأثير الجرعة والتأثير الفينولوجى والحساسية للظروف البيئية .

REFERENCES

Beck, S.D. and J.C. Reese. (1976). Insect-plant inter-actions: nutrition and metabolism. Recent Adv. Phytochem. 10: 41-92.

Bell, A.A. and R.D. Stipanovic. (1978). Biochemistry of disease and pest resistance in cotton Mycopathologia 65: 91-106.

Bird, L.S., K. El-Zik, E. Free, and R. Arnold. (1968). Concepts and procedures for developing cottons with multiple disease resistance. Proc. Beltwide Cotton Prod. Res. Conf., Cotton Disease Council 28: 158-162.

Cook, C.G., and K.M. El-Zik. (1992). Cotton seedling and first bloom plant characteristics: relationship with drought-influenced boll abscission and lint yield. Crop Sci. 32: 1464-1467.

Cook, C.G. and K.M. El-Zik. (1992). Fruiting and linit yield of cotton cultivars under irrigated and nonirrigated conditions. Field Crops Res. 33: 411-421.

Dahms, R.G. (1943). Insect resistance in sorghums and cotton. J. Am. Soc. Agron. 35: 704-715.

El-Zik, K.M. and P.M. Thaxton. (1989). Genetic improvement for resistance to pests and stresses in cotton. P. 191-224.

El-Zik, K.M., and P.M. Thaxton (1990). Registration of Tanmcot HQ95' cotton. Crop Sci. 30: 1359-1360.

El-Zik, K.M., P.M. Thaxton, and R.A. Sequeira. (1991). Genetic gains in resistance to pests in the MAR Germplasm. II. Insects. Proc. Beltwide Cotton Prod. Res. Conf., Cotton Improv. Conf. 43: 545-549.

Hernandez, H.V. (1987). Effects of cultivar, seed quality, pathogen virulence, inoculum density, and seed depth on host resistance to the seed-seedling disease complex of cotton. Ph.D. Dissertation, Texas A & M University, College Station, TX. 179 p.

Hyer, A.H., E.C. Jorgenson, R.H. Garber, and S. Smith, (1979). Resistance to root knot nematode Fusarium wilt disease complex in cotton. Crop Sci. 19: 898-901.

Jones, J.E. (1972). Effect of morphological characters of cotton on insects and pathogens. Proc. Beltwide Cotton Prod. Res. Conf., Cotton Improvement Conf. 24: 88-92.

Jones, J.E. (1982). The present state of the art nd science of cotton breeding for leaf morphological types. Proc. Beltwide Cotton Prod. Res. Conf. Cotton Improv. Conf. 34: 93-99.

Lidell, M.C., G.A. Niles, and J.K. Walker, (1986). Response of nectariless cotton genotypes to cotton fleahopper (Heteroptera: Miridae) infestation. J. Econ. Entomol. 79: 1372-1376.

Meredith, W.R., Jr., V. Meyer, B.W. Hanny, and J.C. Bailey. (1979). Influence of five Gossypium species cytoplasms on yield, yield components, fiber properties, and insect resistance in upland cotton. Crop Sci. 19: 647-650.

Muller, K.O. (1959). Hypersensitivity. p. 469-519. In. J. G. Horsfall and A.E. Diamond (eds.), Plant Pathology, Vol. I. Academic Press. NY.

Niles, G.A.)1980). Breeding for resistance to insect pests. p. 337-369. In F.G. Maxwell and P.R. Jennings (eds.), Breeding Plants Resistant to Insects. John Wiley & Sons, NY.

Pinter, R.H. (1951). Insect Resistance in Crop Plants. The McMillan Co., NY. 520 p.

Poswal, M.A.T. (1986). Gene action and inheritance of resistance to Rhizoctonia solani and Phythium ultimum in cotton seedlings. Ph.D. Dissertation, Texas A & M University, College Station, TX. 192 p.

Reinisch, A.J., J.M. Dong, C.L. Brubaker, D.M. Stelly, J.F. Wendel, and A.H. Paterson (1994). A detailed RFLP map of cotton, Gossypium hirsutum x G. Barbadense: chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. Genetics (In Press).

Russell, G.E. (1978). Plant Breeding for Pest and Diseqse Resistance. Butterworths, London. 485 p.

Sequeira, R.A., K.M. El-Zik, and T.J. Gerik (1994). Production and partitioning of biomass in irrigated and water stressed cotton cultivars. Crop Sci. 34: (In Press).

Shepherd, R.L. (1987). Registration of three root-knot resistant cotton germplasm lines. Crop Sci. 27: 153.

Thaxton, P.M., K.M. El-Zik, A.A. Bell, and G.W. Tribble, (1988). Tannin and gossypol content of MAR and non-MAR cottons. Proc. Beltwide Cotton Prod. Res. Conf., Joint Session: Cotton Improv. Conf. and Cotton Disease Council 48: 554.

Van der Plank, J.E. (1963). Plant Diseses: Epidemics and Control. Academic Press, NY. 349 p.

Wilson, F.D. and B.W. George, (1982). Effects of okra-leaf, frego-bract, and smooth-leaf mutants on pink bollworm damage and agronomic properties of cotton. Crop Sci. 22: 798-801.

Wilson, F.D. (1987). Pink bollworm resistance, lint yield, and earliness of cotton isolines in a resistant genetic background. Crop Sci. 27: 957-960.

Zummo, G.R., J.H. Benedict, and J.C. Segers, (1983). No-choice study of plant-insect interactions for Heliothis zea (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) on selected cottons. Environ. Entomol. 12: 1833-1836.

الفصل الثاني

موضوعات مختارة عن التكنولوجيا الحيوية والاجهادات على النباتات

مقدمـــــــة :

بعد أن انتهيت من الفصل الأول عن المقاومة النباتية ضد الآفـــات الرئيســية مــن حشرات وفطريات وبكتريا وفيروسات بالإضافة إلي المقاومـــة للاجــهادات البيئيــة مــن حرارة ورطوبة وجفاف وملوحة وعلاقتها بالتكنولوجيا الحيوية وصحة النباتات وانعكـــاس هذه العلاقات والاقترابات على الإنتاجية المحصولية والجودة وإمكانية تحقيق بعض الصفات المرغوبة مثل الهروب من الإصابة بالآفات أو تحمل الإصابة أو النضج المبكــر ... الــى غير ذلك من الصفات والتراكيب المورفولوجية أو الفسيولوجية أو البيوكيميائية فضلــت أن أشير فى عجالات بسيطة عن بعض الاتجاهات الحديثة فى الاستفادة من التكنولوجيا الحيوية والتطبيقات الناجحة كما هو منشور فى كتاب مؤتمر صحة النباتات الذى عقد بمدينة الفيــوم فى الفترة من مارس ٢١ – ٢٤ عام ١٩٩٤ تحت عنوان الإدارة المتكاملة للآفات والبيئة .

المقالة الأولى كانت للزميل العزيز أ٠د٠ مجدى مدكور مدير معهد بحوث الهندسة الوراثية الزراعية بمركز البحوث الزراعية المصرية تحت عنوان " الهندسة الوراثيــــة : الوسيلة الوحيدة فى حل مشاكل الاجهاد فى النباتات " استعرض سيادته فى تلخيص سـريع عن اعتماد البشر بشكل كامل على الإنتاج الزراعى للحصول على احتياجاته من الغـــذاء . من سوء الطالع أن الناتج الزراعي الحالى لا يفى بالحد الأدنى من حاجات الســكان . مــن اكثر الاسهامات التى تحقق زيادة إنتاج الغذاء تلك التى تتعلق بحماية المحاصيل من همــوم الآفات والأمراض والحشائش . الفقد الكلى للإنتاج العالمى الزراعى يتراوح من ٢٠-٤٠% بما فيها الفقد أثناء الزراعة وبعد الحصاد والذى يحدث بالرغم من الاســتخدامات المكثفــة للمبيدات .

فى هذا المقام يمكن للتكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية أن تقدم فوائد كثيرة للبيئــة فى مجال وقاية النباتات من خلال إحلال الفلسفة الحالية للرش العميانى للمحاصيل بمبيــدات الحشائش والمبيدات الفطرية والحشرية بإدخال المقاومة النباتية المهندسة وراثيـــا لحمايــة النباتات من هجوم وأضرار الآفات والحشائش . لذلك تعتبر الهندسة الوراثية مناسبة جــداً للزراعة فى الدول النامية لأنها تقع تحت مسمى ومفهوم " صديقة المستخدم النــهائى User Friendly " . إذا اسخدمت هذه التكنولوجيا بالأسلوب والطريقة السليمة ستكون وبدون شك

تكنولوجيا خضراء "technology is green" لقد انشىء معهد بحوث الهندسة الوراثية الزراعية (AGERI) كأحد كيانات مركز البحوث الزراعية (ARC) لنقل وتطبيق هذه التكنولوجيا . من أهم الأهداف الكبرى للمعهد إنتاج النباتات المتحولة أى المهندسة وراثيا التى تحقق المقاومة ضد :

أ – الضغوط الحيوية الناتجة من الآفات الفيروسية والفطرية والحشرية .

ب– الضغوط غير الحيوية كما فى الظروف البيئية غير المناسبة مثل ملوحة التربة والجفاف والحرارة المرتفعة .

كل هذه الضغوط تمثل مشاكل زراعية كبرى تؤدى الى فقد مأساوى فى المحصول وهو ما يمثل خسارة اقتصادية كبيرة للزراعة والاقتصاد المصرى .

لقد بنى مشروع معهد بحوث الهندسة الوراثية على مفهوم الإسهام فى البرنامج القومى الذى يركز على المشاكل المصرية . لقد تمثلت الأهداف الرئيسية فى تطوير والحصول على الأصناف المهندسة وراثيا من المحاصيل ذات الأهمية الاقتصادية فى مصر. لذلك كان من الضرورى استخدام أحدث تكنولوجيات الهندسة الوراثية لتحقيق هذه الأهداف . لقد اضطلع المشروع القومى بمدى متزايد من التحديات العلمية والتقنية لفن تكنولوجيا الهندسة الوراثية ونقل الجينات . إن طرق التعديل أو التحوير الجينى مثل الكلونة والتتابع والتحوير وعمل مكتبات جينومية وتلك المعنية بالحمض النووى cDNA وخلق النباتات فى مزارع الأنسجة مجرد أمثلة لطرق البيولوجيا الجزيئية والخلوية والتى تستخدم لإنتاج النبات المهندس وراثيا . الإدخال الناجح لهذه المشاريع سوف تعطى إمكانيات قومية مصرية عن الإنتاج المتواصل للمحاصيل الهامة ذات الأهمية الاقتصادية بما يتوافق مع الأمان البيئى ونظافة البيئة . من أمثلة هذه البرامج :

١–الهندسة الوراثية للبطاطس المقاومة للفيروسات فى مصر (PLRV , PVY , PVX) وإنتاج الطماطم المهندسة وراثيا المقاومة للفيروسات مثل فيروس تجعد أوراق الطماطم الأصفر (TYLCV) وإدخال الجين المسئول عن المقاومة للفيروس فى الكوسة والشمام ضد فيروس الموزايك الأصفر الزركينى (ZYMV) وفى النهاية إنتاج الفول المهندس وراثيا المقاوم لفيروس موزايك الفول الأصفر (BYMV) وفيروس نكروز الفول الأصفر (FBNYV) .

هذه المشروعات تتمشى مع الأهداف الزراعية لأنها تعكس التأثيرات الإيجابية المعنوية على الإنتاج الزراعى والتبادل الخارجى . إن نجاح إنتاج نباتات قطن مهندسة وراثيا بها بكتريا B.t المقاومة للآفات الحشرية الكبرى سوف توفر ٥٠ مليون دولار

أمريكى سنويا من جملة شراء المبيدات (هذا كلام سابق لأوانه). إن نجاح الهندسة الوراثية فى لفت الزيت بما يوازى ٤٠٠ ألف طن من زيوت الطعام التى تستورد الى مصر . على نفس المنوال فان أصناف البطاطس المهندسة وراثيا المقاومة لبعض الفيروسات والآفات الحشرية سوف تحقق توفير حوالى ٣٣ مليون دولار سنويا فى استيراد تقاوى البطاطس .

مقالة عن " استخدامات التكنولوجيا الحيوية فى التعامل مع التلوث البيئى " للدكتور البرت أديس مدير برنامج التكنولوجيا الجزيئية والخلوية بقسم الميكروبيولوجى بكلية علوم الحياة جامعة ميرلاند بالولايات المتحدة الأمريكية . من البداية فإن الثورة التى حدثت فى البيولوجيا الجزيئية قدمت إمكانيات لإحداث تحوير وراثى فى الكائنات الدقيقة بما يحقق مطالب البشر . الاختراعات والتجديدات فى التكنولوجيا الحيوية من جراء تطبيقات دمج "الدنا" قدمت مجالات متعددة للاستفادة من هندسة الكائنات الدقيقة والنباتات فى المجالات الزراعية ومكافحة التلوث . إن النجاح فى إنتاج مبيدات فيروسية أو بكتيرية والنباتات المقاومة للآفات أو الكائنات الدقيقة المحورة وراثيا سوف تعضد وتزيد من كفاءة التخلص من العناصر الثقيلة بما يؤدى الى تحقيق مكاسب بيئية . الايدروكربونات عبارة عن ملوثات منتشرة الحدوث فى البيئات الملوثة بمنتجات معاملة الأخشاب والزيوت المنسكبة والترسب من تنكات التخزين وغيرها . العديد من هدف المركبات المخلقة تنهار بواسطة مجاميع ميكروبية متنوعة والتى تعمل مجتمعة كما لو كانت فى اتحاد أو تكامل (Alexandria ، ١٩٩١) . العديد من أنواع الميكروبات ذات المقدرة على انهيار المواد الغريبة xenobiotcs تم تعريفها . من الأنواع التى حظيت بمزيد من الدراسات هى البسيدوموناس G4 . يمكن لهذه السلالة أن تحدث انهيار فى العديد من المركبات وقد أظهرت كفاءة عالية جدا فى تنظيف المواقع التى يوجد فيها مخاليط من المواد الغريبة السامة (Nelson وآخرون ، ١٩٩٠) . لقد نشر أن سلالة الكلوستريديوم قادرة على تمثيل مركبات التراى كلورو إثيان ، تراى كلوروميثان ، تتراكلوروميثان (Galli and Carty ، ١٩٨٩) . لقد تمكنت عزلة من الأزوتوباكتر من إحداث انهيار فى مبيدات الحشائش من مجموعة الدانيتروفينول (Wallnoefer وآخرون ، ١٩٧٨) . البكتريا الآكلة للميثان Methanotrophic تتمكن من تكسير مركبات الترايكلورواثيلين والدايكلورواثيلين والفينيل كلوريد (Foge وآخرون ، ١٩٨٦) .

بالرغم من الآفاق والآمال المعلقة على هذه التكنولوجيات فان التقدم فى تطوير الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا ذات القدرات الخاصة على التعامل مع مشاكل التلوث كان محدودا ومازالت هذه الاقترابات فى مراحل التجريب . فى الولايات المتحدة الأمريكية تشترك عدد محدود من الشركات فى الخدمات بالوسائل الحيوية وهى تضطلع فى الغالب

بإنتاج خلائط من الكائنات الدقيقة الطبيعية لمعالجة مياه الصرف وغيرها من اتجاهات إدارة المخلفات . كذلك فان الانهيار بالوسائل الحيوية Bioremediation تحقق مميزات خفض التكلفة نسبيا ومحدودية الخلل الطبيعى للمواقع المعاملة ومع هذا توجد العديد من العقبات التقنية التى تحد من تطبيقاتها .

استخدامات تكنولوجيا " الدنا " المندمج

في الوقت الراهن فان النجاحات فى التكنولوجيا الحيوية تحققت فى شركات الصيدليات . فى حالة الانهيار الحيوى علقت الآمال على تطور كائنات دقيقة ذات مقدرة على معادلة المخلفات الخطرة فى المواقع المختلفة . لقد كان Chakoabarty أول من صمم سلالات من بكتريا بسيدوموناس القادرة على هدم الزيت من خلال إدخال بلازميدات مختلفة لقد أدى ذلك الى تطوير الحصول على بكتريا قادرة على معدنة أقسام عديدة من الايدروكروبونات . هذه الكائنات الدقيقة لم تستخدم على الاطلاق على المستوى الحقلى . الحقيقة التى تشير الى أنه لم يستخدم حتى الآن ميكروبات مهندسة وراثيا فى التخلص من العوادم والملوثات ترجع الى العديد من الصعوبات والعوائق التى يجب التغلب عليها فى تصميم وتطوير هذه الكائنات الدقيقة فى التجارب الحقلية . فى البداية كانت التحويرات التى تجرى فى الكائنات الحية لإنتاج سلالات نشطة ذات الصفات المرغوبة من خلال تكنولوجيا دمج "الدنا" تأخذ وقتاً طويلاً وما تزال المعلومات الخاصة بالكيمياء الحيويّة فى اتجاه مسارات الانهيار محدودة . المسارات التى تؤدى الى معدنة mineralization المواد الغريبة تتكون من خطوات متعددة مساعدة والتى تعقد وتصعب من آفاق هندسة الكائنات المرغوبة . بمجرد إنتاج هذه السلالات فان السلالات التى تنتج فى المعمل قد لا تعيش وتتأقلم مع التحديات الموجودة فى الحقول لأن كل موقع ملوث يضع عقبات أمام السلالات الحيوية المهندسة وراثيا . فى النهاية وبمجرد إطلاق الكائنات المهندسة وراثيا فى الحقول يجب اجراء تحليل خاص بتقييم المخاطر "risk assessment" . الخطوات التشريعية عادة تكون غير واضحة وغير مطورة جيدا . كل هذه العوامل تحتم اجراء بحوث وتطوير على الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا بشكل اقتصادى .

أستعراض جميع المشاكل يشير الى جدوى الحصول على كائنات ذات مواصفات خاصة تحقق انهيار الملوث بشكل حيوى . مثال ذلك الجينات التى تشفر الانزيمات المشتركة فى انهيار بعض مركبات البيفنيل عديدة الكلورين (PCB) حيث تم غرسها فى نسخة عالية العدد للبلازميد ومن ثم فان البكتريا التى تسكن فى الناقل تعبر عن أنشطة انهيار (البى سى بى) (Mondello ، ١٩٨٩) . فى الغالب فان أنشطة الانزيمات فى

مسارات انهيار الملوثات تتزايد بشكل معنوى بعد تعرض الكائن العائل لمحفز خاص والذى قد لا يكون موجودا فى الموقع الملوث . من الناحية الشكلية والمفهومية فان الطفرات التى أدخلت فى بادئات مناسبة قد تسبب مستويات متزايدة من التعبير الجينى الذى يشفر الانزيمات النشطة فى تمثيل المواد الغريبة مما يؤدى الى إنتاج ميكروبات ذات مقدرة عريضة ومتزايدة على إنهيار المواد الغريبة . الطفرية موجهة الموقع قد تستخدم لتوسيع تخصصية وسط التفاعل لانزيم خاص أو تغير من دور الانزيم فى مسار الانهيار . فى النهاية وإسهاما فى تقييم المخاطر فان تفاعل سلسلة البوليميريز PCR لتخليق "الدنا" قد تستخدم فى تعقب الكائنات المحورة فى الحقل (Mullis ، ١٩٩٠) .

استخدام الطرق التقليدية

المعاملات الزراعية من أكثر الطرق شيوعا فى معالجة المخلفات . تتضمن هذه الطرق إضافة المواد المغذية والماء وفى بعض الأحيان مصدر اكسجين (فوق أكسيد الايدروجين) وهى من أحد المتطلبات الضرورية لتحقيق النمو الميكروبى وتمثيل الملوثات. فى الوقت الراهن تتركز معظم المجهودات الحقلية نحو تشجيع وتحفيز نمو الكائنات الدقيقة المتوطنة أو تعضيد مجموع الميكروبات بكائنات خارجية ثم عزلها من المواقع التى سبق معاملتها أو من مواقع متشابهة (Fox ، ١٩٩٢) . لقد استخدم هذا الاقتراب فى المجهودات الخاصة بمجابهة تسرب الزيت . أن تركيزات معينة من النتروجين والفوسفور الميسر غالبا ما يحدد أنشطة الإنهيار بالميكروبات . بالنسبة لانسكاب الزيوت فى البحار فانه يستخدم الأسمدة المحبة للزيوت لتعظيم التداخلات مع الزيت عند طبقة السطح بين الزيت والماء وتنشيط انهيار الايدروكربونات بالميكروبات . مثال ذلك أن بعد إنسكاب الزيت فى منطقة Amoco cadiz عام ١٩٧٨ قامت إحدى الشركات الفرنسية بإنتاج مركب (Inipol EEAP22) الذى يحتوى على حامض الأوليك واللوريل فوسفات واليوريا كمصدر للكربون والفوسفات والنتروجين . لقد أثبت هذا المركب كفاءة عالية وأعطى آمالا كبيرة تشجع مجهودات التخلص الحيوى من الملوثات (Atlas ، ١٩٩٣) .

الوراثة التقليدية يمكن أن تستخدم كذلك فى تطوير وتحوير الكائنات الدقيقة بما يجعلها تحمل الصفات المطلوبة . فى العادة ان هذه الكائنات لا تتعرض أو تدخل تحت نطاق التحديات والعقبات التشريعية التى تتبع مع الكائنات المحورة من خلال دمج "الدنا" . لقد استخدمت العديد من الاقترابات للحصول على بكتريا ذات صفات مرغوبة ومتميزة . الطفرية من خلال التشعيع بالأشعة فوق البنفسجية والانتخاب فى مفاعل حيوى أدى الى عزل كائنات دقيقة قادرة على النمو على حامض ٤- كلوروبنزويك أو حامض ٤،٢-

دايكوروبنزويك (Kai وآخرون ، ١٩٩١) . يمكن أن تستخدم Transposons لتحوير قدرات العوائل حيث أن الانزيمات ذات المسارات المعينة لتمثيل الايدروكربونات تشفر بالجينات على الترانسبوسونات مثل نظام Tol system ومسار هدم الكلوروبنزوات على الترانسبوسون Tn5271 (Tsenda and Lino ، ١٩٨٧) .

الجديد والاكتشافات عن الانهيار الحيوى فى كلية العلوم جامعة ميرلاند كلويج بارك بالولايات المتحدة الأمريكية . لقد أشار الدكتور آديس الى عدة مجالات منها :

١-التخلص من المعادن باستخدام بوليمرات البكتريا : بالنظر الى تلوث المستنقعات والبحار بالمعادن الثقيلة أجرى الدكتور رونالد بينر بقسم الميكروبيولوجى دراسات عن جدوى تجهيز مرشح للانهيار الحيوى " Bioremediation Filter " باستخدام سكريات عديدة خارجية بكتيرية ذات صفات مناسبة للارتباط مع المعادن .

٢- عمل السماد البلدى Composting : من المعروف أن حوالى ٦٠-٩٠% من المخلفات الصلبة فى البلديات قابلة للانهيار الحيوى . لقد قام الدكتور فرانسيس جوين ومعاونوه فى قسم البساتين بإجراء دراسات مكثفة عن ملائمة الحمأة الناشئة من مخلفات البلديات وقطع الخشب الصغيرة ومخلفات البلديات الأرضية لنمو المحاصيل البستانية فى أوانى وفى الحقل . لقد أثبتت هذه الدراسات أن استخدام هذه الأسمدة من المخلفات توفر كميات كبيرة من الأسمدة التقليدية وتقدم مصدر جيد للفوسفور والكالسيوم والماغنسيوم ولحد ما النتروجين والبوتاسيوم (Gouin ، ١٩٩٣) .

٣-استخدام النباتات فى التخلص الحيوى من الملوثات : بعض الأنواع النباتية تجمع المعادن من التربة بتركيزات عالية نسبيا عما هو الحال مع الكتلة الحيوية للنباتات (Reeves and Brooks ، ١٩٨٣ ، Baker & Brook ، ١٩٨٩). لقد نجح الفريق البحثى برئاسة دكتور سكوت أنجل - قسم المحاصيل ومعاونوه باستخدام نباتات ذات قدرات فائقة على تراكم المعادن حتى يمكنها إزالة العناصر الثقيلة من التربة . يجرى العمل جديا فى ايجاد نباتات تركز الزنك والكادميوم كى تستخدم فى المواقع الملوثة بالمعادن الثقيلة من جراء الصناعات المحلية .

كما سبق القول بأن الجميع يتكلم ويتناول بفهم أو باجتهاد عن آفاق وآمال التكنولوجيا الحيوية فى حل المشاكل الزراعية والبيئية والاسهام فى تقليل الفجوة الزراعية الغذائية .

لذلك يتسابق الكل خاصة رجالات التعليم فى وضع وتطوير المناهج الدراسية المرتبطة بهذه التكنولوجا الجديدة القديمة فى كل مراحل التعليم . من هذا المنطلق تم عقد المؤتمر العربى الأول حول التكنولوجيا البيولوجية والتعليم فى الفترة من ١٣-١٤ سبتمبر ٢٠٠٠ فى مركز تطوير العلوم بجامعة عين شمس بالتعاون مع المكتب الاقليمى لليونسكو بالقاهرة والمركز القومى للبحوث التربوية والتنمية . شارك فى المؤتمر العديد من قيادات التكنولوجيا الحيوية والتعليم فى مصر والبلدان العربية الشقيقة . نظرا لأهمية الموضوع وانعكاساته على الجيل الحالى والأجيال القادمة وارتباطه بالتقدم آثرت أن أضع بين يدى القارىء الكريم بعض الموضوعات الهامة :

١- " **استراتيجية البيوتكنولوجى فى القطاع الزراعى بمصر** " للدكتورة هنية عباس الأتربى وكيل معهد بحوث الهندسة الوراثية الزراعية - مركز البحوث الزراعية - وزارة الزراعة ولأترك المقالة كما هى :

يضطلع معهد بحوث الهندسة الوراثية الزراعية بتنفيذ جزء من خطة وزارة الزراعة فى مجال البيوتكنولوجى والخاصة بتطبيقات البيولوجيا الحيوية فى النبات وتهدف الخطة البحثية للمعهد الى استخدام التقنيات الحديثة فى البيولوجيا الجزيئية لزيادة إنتاجية المحاصيل المختلفة من وحدة المساحة مع التقليل من استخدام المبيدات وإنتاج أصناف جديدة من المحاصيل قادرة على التأقلم والإنتاج تحت ظروف بيئية قاسية من حرارة وجفاف وملوحة كما تهدف الخطة الى العمل على تدريب كوادر فنية فى مجال البيولوجيا الجزئية تمكنها من الاستيعاب والتعامل مع التقنيات الحديثة مع إيجاد آليات لنقل ما يتوصل اليه المعهد من نتائج الى القطاع الخاص ليقوم بدوره فى عملية الإنتاج والتسويق وبذلك يتم ربط احتياجات السوق بالخطة البحثية على أسس اقتصادية .

وتشمل الخطة البحثية على المحاور التالية :

أولا : انتاج مبيدات حيوية Biopesticides لها القدرة على مكافحة الآفات الزراعية مع عدم الإضرار بالبيئة .

ثانيا : إنتاج أصناف نباتية مقاومة للفيروسات (بطاطس - طماطم - موز - ومن القرعيات الكوسة والخيار والكانتالوب والبطيخ) .

ثالثا : إنتاج محاصيل مقاومة للحشرات (القطن - البطاطس - الذرة الشامية) .

رابعا : إنتاج محاصيل مقاومة للفطريات (الفول البلدى - الذرة الشامية - الطماطم) .

خامسا : إنتاج محاصيل لها القدرة على تحمل الظروف البيئية الغير ملائمة مثل الحرارة والجفاف والملوحة (القمح - القطن - الذرة - الطماطم) .

سادسا : تحديد الدلائل الجزيئية Molecular Markers المختلفة لرسم الخرائط الوراثية للمحاصيل الاقتصادية الهامة بهدف الاستعانة بهذه الدلائل فى عملية الانتخاب فى برامج التربية (MAS) Marker assisted selection كما تستخدم الدلائل الجزيئية فى إيجاد البصمة الوراثية للسلالات والهجن والأصناف بغرض تسجيلها.

سابعا : عزل الجينات وكلونتها مع تحديد تتابع النيوكليوتيدات بها Sequencing ثم الحصول على التعبير الجينى من خلال نقل الجين الى ناقل خاص Experssion Vector .

كما قام المعهد بانشاء مكتب الملكية الفكرية ونقل التكنولوجيا يتولى تقديم المساعدة الفنية الى الباحثين بالمعهد فى كيفية حماية أعمالهم الإبداعية والكشوفات العلمية الغير مسبوقة وذلك تحت قوانين حماية الملكية الفكرية وكذلك يتولى المكتب عمليات التسويق والترويج والترخيص للملكيات الفكرية لأعضاء الهيئة البحثية بما يضمن حقوق كل من الباحث / المعهد / المرخص له وذلك بما يتفق مع طبيعة الملكية الفكرية المطروحة .

ولتنمية الموارد المالية للمعهد حتى يتمكن من الاعتماد مستقبليا على التمويل الذاتى لإجراء الأبحاث المتعلقة بخطة مركز البحوث الزراعية فى مجال البيوتكنولوجى تم إنشاء وحدة خدمات الهندسة الوراثية وهى وحدة ذات طابع خاص .

٢- **" المناورات الجينية ودورها فى تطوير التكنولوجيا الحيوية "** للأستاذ الدكتور عبد الفتاح بدر محمد بدر أستاذ الوراثة ورئيس قسم النبات .

الجين هو الوحدة الفيزيائية والوظيفية الأساسية في الوراثة . ومن الناحية التركيبية فان الجين هو جزء فعال من حبل الجينات المتصل الذى يتكون من وحدات متكررة ملايين المرات . وتتركب كل وحدة من سكر منزوع الاكسجين ومجموعة فوسفات وأحد أربعة قواعد نتروجينية معروفة هى الأدنين – الجوانين – الثايمين – السيتوسين فيما يسمى بالحمض النووي الديوكسي ريبوزى (Deoxyribonucleic acid) والذى جرى اختصار أسمه الى دنا باللغة العربية وهو نفس الاختصار باللغة الإنجليزية (DNA) وفى كثير من اللغات الأخرى . وقد شهد عالمنا المعاصر تزايدا مضطردا فى استخدام ما يسمى بالمناولات الجينية (anipulation)أى التدخل فى الجينات بالعديد من الطرق العلمية لتعظيم الفائدة منها بتطبيقات حديثة فيما يطلق عليها الهندسة الوراثية (Genetic engineering) كان حجر الزاوية للمناولات الجينية اكتشاف انزيمات القصر (Restriction enzymes) التى تقطع حبل دنا عند مواضع معروفة ولكل انزيم منها موضع لا يعرفه سواه . وتتفق مواضع التعرف لكل انزيمات القصر ان ترتيب القواعد النتروجينية فى ضفيرتى حبل دنا

عندها يقرأ من اليمين الى اليسار كما يقرأ من اليسار الى اليمين . وكذلك فصل وتنقية انزيمات الوصل (Ligases) التى تعمل على ربط نهايات أجزاء دنا ببعضها وتطوير استخداماتها خارج الخلايا الحية . وفضلا عن الدور الأساسي لانزيمات القصر والوصل فى المناولات الجينية فان تلك المناولات تتطلب عدة وسائل أخرى أهمها وجود نواقل الجينات وهى الوسائط التى يمكنها نقل أجزاء الجين دون أن يفقد كينونته (Gene vectors) . وهذه الوسائط هى أجزاء دنا طبيعية مثل البلازميدات أو دنا الفيروسات ولكن البعض منها مصطنعة تتكون من أجزاء طبيعية وأخرى مضافة . وتشمل وسائل تناول الجينات إدخال الجينات أو أجزاء من دنا المحمولة على نواقل الى خلايا بكتريا القولون لإكثارها وحفظها فيما يعرف بمكتبات الجينوم واستنساخ الجينات (أجزاء دنا) باستخدام تفاعل البوليميريز المتسلسل . كما تشمل فصل أجزاء دنا باستخدام التفريد الكهربى وتطبيق كثير من طرق البيولوجيا الجزيئية التى تتطلب استخدام بعض البصمات أو الدلائل البيولوجية (Biomarkers) . فى هذا المقال نتناول بعض التفصيل المبسط ايضاح وسائل تناول الجينات لما لها من دور فعال فى تطوير التكنولوجيا الحيوية . أما الهدف الأهم لهذا المقال فهو إدراكنا التام لأهمية التعريف بالتكنولوجيا الحيوية وضرورة تدريسها ضمن المناهج التعليمية بمدارس التعليم العام والجامعى حتى يتمكن الطلاب من استيعاب المفاهيم الأساسية وإدراك الأهمية الكبيرة لهذه التكنولوجيا العصرية فى مرحلة التعليم . وحيث أن عملية تداول الجينات هى بمثابة القلب من تطوير التكنولوجيا الحيوية فان تبسيطها وإيضاح وسائلها للطلاب والمعلمين يعتبر من لوازم إدخال التكنولوجيا الحيوية فى مناهج التعليم والتدريب.

٣- " تضمين بعض موضوعات التكنولوجيا البيولوجية فى محتوى مقررات العلوم بمرحلة التعليم الأساسى " إعداد الدكتور مندور عبد السلام فتح الله عبد السلام .

تهدف هذه الدراسة التعرف على :

١-الموضوعات المرتبطة بأبعاد التكنولوجيا البيولوجية التى يمكن تقديمها فى مقررات العلوم بمرحلة التعليم الأساسى من وجهة نظر المتخصصين .

٢-مدى تناول كتب العلوم بمرحلة التعليم الأساسي للموضوعات المرتبطة بأبعاد التكنولوجيا البيولوجية الثمانية .

٣-الموضوعات المرتبطة بأبعاد التكنولوجيا البيولوجية التى يجب تضمينها فى مقررات العلوم بمرحلة التعليم الأساسى من وجهة نظر المعلمين والموجهين بمرحلة التعليم الابتدائى والاعدادى .

٤-تقديم تصور يتضمن بعض الموضوعات المرتبطة بأبعاد التكنولوجيا البيولوجية في مقررات العلوم بمرحلة التعليم الأساسي.

ولتحقيق هذه الدراسة قام الباحث بتصميم أداة لتحليل محتوى كتب العلوم بالتعليم الأساسي واستبيان قدم الى معلمى وموجهى تعليم العلوم بمرحلة التعليم الأساسى بهدف استطلاع وجهة نظرهم حول الموضوعات المرتبطة بالتكنولوجيا البيولوجية التى يجب تضمينها بمقررات العلوم بمرحلة التعليم الأساسى .

ومن أبرز النتائج التى توصل اليها فى هذه الدراسة ما يأتى :

١-تم تحديد الموضوعات المرتبطة بأبعاد التكنولوجيا البيولوجية التي يمكن تقديمها في مقررات العلوم بمرحلة التعليم الأساسى من وجهة نظر المتخصصين فى (٤٧) موضوعا .

٢-كان عدد الموضوعات المرتبطة بأبعاد التكنولوجيا البيولوجية المتوفرة فى مقررات العلوم بمرحلة التعليم الأساسى (١٢) موضوعاً موزعة على الصفوف (الرابع موضوعين ، الخامس ثلاثة موضوعات ، والأول الاعدادى موضوعين والثانى الاعدادى موضوعين والثالث الاعدادى ثلاثة موضوعات) وذلك بنسب مئوية لا تزيد عن ١٢% فى أى صف من الصفوف بالنسبة للموضوعات المقدمة فى هذا الصف .

٣-تم تحديد الموضوعات التي يرى معلمى وموجهى العلوم للتعليم الابتدائى والاعدادى تضمينها فى مقررات العلوم .

٤-تم اختيار الموضوعات الأعلى فى النسبة المئوية للمتوسط الوزنى وتم تقديم تصور بتضمينها فى مقررات العلوم فى الصفوف الخمس بمرحلة التعليم الأساسى .

وفى ضوء النتائج قدم الباحث التوصيات الآتية :

١-ضرورة الاهتمام بنشر الوعى بموضوعات التكنولوجيا البيولوجية فى مقررات العلوم الحالية بمرحلة التعليم الأساسي (أتمني أن يجد وقاية النبات مكانا) .

٢-إعادة النظر فى محتوى كتب العلوم الحالية والتأكيد على ضرورة تناوله للموضوعات الكافية والمناسبة من التكنولوجيا البيولوجية .

٣-ضرورة اهتمام القائيمن علي تطوير المناهج بالتعليم الأساسي بتضمين موضوعات التكنولوجيا البيولوجية التى توصلت اليها الدارسة الحالية والاستفادة من التضمين المقترح .

٤- " تصور مستقبلي لمقررات دراسية في التكنولوجيا الحيوية بمراحل التعليم العام بمصر " للدكتور شعبان حامد على ابراهيم والدكتور عيد أبو المعاطى الدسوقى .

ساعد النظام الدولى الجديد على زيادة الوعى بالدور الحاكم والحاسم للمناهج الدراسية فى صياغة مستقبل الأمم . واعتبر تطوير المناهج الدراسية وتحديثها مدخل لتجويد التعليم وأولوية من أولويات العمل القومى ، وعنصرا رئيسيا فى المشروع الحضارى ومكونا أساسيا فى خطط التنمية بمصر .

لذلك تسعى الدراسة الحالية فى إطار تحليلى استشراف آفاق المستقبل لما يجب أن تكون عليه مقررات دراسية فى التكنولوجيا الحيوية بمراحل التعليم العام (المرحلة الابتدائية والمرحلة الاعدادية ، والمرحلة الثانوية) ، ومن ثم تهدف الدراسة الحالية الى :

- اقتراح مقررات دراسية مستقبلية تناسب العقود الأولى من القرن الحادى والعشرين لمراحل التعليم العام بمصر فى البيوتكنولوجي ، متداخلة مع مناهج العلوم بالتعليم الابتدائى والاعدادى ، ومنفصلة بالتعليم الثانوى .
- بناء خريطة مدى وتتابع توضح نمو وعلاقة المفاهيم الرئيسية فى المقررات المقترحة وذلك بطريقة عرضية ورأسية .
- إستخدام أسلوبى السيناريو ودلفى فى الدراسات المستقبلية كمنهج بحث فى الدراسة الحالية .
- اقتراح الخطة الزمانية ووسائل وأساليب التنفيذ لهذه المقررات .

وتأخذ الدراسة الحالية بالعقود الأولى من بدايات القرن الحادى والعشرين مدى زمنى لها وذلك لأن صدق التنبؤ يقل كلما زاد البعد الزمنى .

وبتحليل محتوى مناهج العلوم بمراحل التعليم العام فى مصر وجد أن المعلومات التى تتضمنها عن التكنولوجيا الحيوية نادرة ما عدا منهج الأحياء بالصف الثانوى العام فهى قليلة لا تتناسب مع طبيعة العصر الذى نعيشه ولا تلبى أساسيات المعرفة حول التكنولوجيا الحيوية المطلوب الإلمام بها فى السنوات المقبلة ، ومن ثم توصلت الدراسة الحالية الى اقتراح تصور لمقررات فى التكنولوجيا الحيوية تلبى حاجات المعرفة العلمية فى السنوات الأولى للقرن الحادى والعشرين على النحو الآتى :

- مفاهيم علمية فى البيوتكنولوجيا تتضمن مناهج العلوم بالمرحلة الابتدائية (الصفوف الرابع والخامس والسادس) وتناسب تلاميذ هذه المرحلة العمرية من مفاهيم أولية وأنشطة حسية ،

- موضوعات متكاملة فى البيوتكنولوجيا تتضمن مناهج العلوم بالمرحلة الاعدادية وأنشطة تمارس من خلال مقررات المجالات الزراعية والاقتصاد المنزلى .
- مقرر دراسى منفصل فى البيوتكنولوجيا وبعض التطبيقات التى يمكن ممارستها داخل المدرسة أو من خلال مؤسسات فى المجتمع المحلى ، وذلك فى المرحلة الثانوية .

٥- " استراتيجية تفريق التكنولوجيا الحيوية لخدمة أهداف التنمية البشرية "
للأستاذ الدكتور زيدان السيد عبد العال أستاذ غير متفرغ بكلية الزراعة – جامعة الإسكندرية ورئيس الجمعية العربية للتكنولوجيا الحيوية .

يعتبر موضوع استراتيجية تطويع التكنولوجيا الحيوية لخدمة أهداف التنمية للحاق بركب التقدم من أهم المواضيع وأعقدها الذى ستجابه به الدول النامية فى الألفية الثالثة . وذلك لاحتكار تلك التكنولوجيا فى الدول المتقدمة وافتقار الدول النامية للكوادر البشرية القادرة على هضمها وفهمها واستيعابها وتوظيفها وتطويعها لخدمة مواطنيها . هذا بالإضافة الى أنها مكلفة وتحميها حقوق الملكية الفكرية والثقافية ومن ثم فهي تكاد تكون خارج نطاق ومقدرة الدول النامية .

نظرا لأن هناك أمية ثقافية بالنسبة للتكنولوجيا الحيوية – الهندسة الوراثية على كافة المستويات – تبدو الحاجة الملحة الى ضرورة وجود آلية لتبسيطها وعرضها وجعلها فى متناول الجماهير على نطاق واسع مستخدمين فى ذلك كافة الأساليب المرئية والمقروءة والمسموعة لتوصيلها إليهم بهدف تنويرهم وتعليمهم وتدريبهم وحفزهم لتبنيها وأعمالها من أجل غد أفضل . ذلك لأن تلك التكنولوجيا سوف تتأثر بها كافة مناحى الحياة وستتحكم فى كافة الأنشطة الثقافية والاجتماعية والاقتصادية والسياسية . وستكون المحرك الرئيسى والدافع لأى تنمية مستقبلية .

لقد أدركت الجمعيات السلمية والمنظمات الدولية ومنها منظمة اليونسكو التابعة للأمم المتحدة أهمية التنمية البشرية فكلفتنى بتقديم مشروع فى يناير ١٩٩٥ يطبق على مدى ٥ سنوات ويستهدف تدريب ٢٦٥١ متدربا ويتكلف حوالى ١٧٧١٠٠٠ دولار بالإضافة الى مساهمة الحكومة .

تمثل الدراسة التى سأبرزها اليوم أمام المؤتمر حصيلة الخبرة فى استخدام الوسائط المتعددة من فيديو وأفلام ومؤتمرات وندوات ومحاضرات وصحف ومجلات ودورات تدريبية ونشرات وملصقات وكتب والتى استعملتها كوسائل عملية على مدى ١٠ سنوات بهدف تنوير الرأى العام وكذلك المتخصصين فى محاولة لإيجاد الكتلة الحرجة اللازمة

لتطبيقات التكنولوجيا الحيوية وإيجاد قاسم مشترك أعظم لتعاون مثمر وبناء بين كافة الوزارات والهيئات ومراكز البحوث والشركات ورجال الأعمال .

لذلك وافق السيد رئيس الوزراء على اقتراح الجمعية العربية للتكنولوجيا الحيوية بإقامة المؤتمر الدولى لتطبيقات التكنولوجيا الحيوية في مجالات البيئة والزراعة والصيدلة والطب فى المدة من ٢٦ – ٢٩ نوفمبر ٢٠٠١ بالتعاون مع كافة الوزارات والجامعات ومراكز البحوث والشركات والصحافة والإعلام بمركز القاهرة الدولى للمؤتمرات .

ليس هذا فحسب بل أن منتدى العالم الثالث قد اختار هذا الموضوع ليكون الكراسة رقم (٢) فى سلسلة كراسات مصر ٢٠٢٠ التى يصدرها مشروع مصر ٢٠٢٠ والذى يهدف الى صياغة عقد من الصور البديلة لأوضاع المجتمع المصرى عام ٢٠٢٠ وبلورة منهج جديد فى شئون إدارة المجتمع والدولة وتنمية رأى عام مهتم بالمستقبل .

٦- " **تجربة جامعة الخليج العربى فى طرح برنامج للدراسات العليا (الدبلوم العالى والماجستير) فى التكنولوجيا البيولوجية** " للسيد رياض يوسف حمزة والسيدة بسمة صادق البحارنة – برنامج التقنية الحيوية بكلية الدراسات العليا بجامعة الخليج العربى .

قامت جامعة الخليج العربى منذ عام ١٩٨٧ بطرح برنامجا فى الدراسات العليا بعنوان برنامج التقنية الحيوية (التكنولوجيا الحيوية) ، والذى يمنح درجة الدبلوم العالى ودرجة الماجستير . ويعتبر هذا البرنامج من أوائل التجارب العربية فى إدخال التكنولوجيا البيولوجية كتخصص شامل تندرج تحته تخصصات فرعية ومقررات مختلفة .

تتناول الورقة أهداف هذا البرنامج والتخصصات الدراسية الثلاثة الرئيسية فيه وهى : التقنية الحيوية الطبية ، التقنية الحيوية الزراعية والتقنية الحيوية البيئية . أن وضع مظلة برنامج شامل فى التكنولوجيا الحيوية يتطلب منهجا دراسيا بينيا تتداخل فيه المقررات وتكمل بعضها البعض ، وسوف تطرح الورقة الخطة الدراسية لمثل هذا البرنامج والتى تعتمد على المقررات الدراسية والبحث العلمى ، حيث ينهى الطالب ٢٤ ساعة معتمدة بالإضافة الى مشروع (أربع ساعات معتمدة) لدرجة الدبلوم العالى ، و ٢٨ ساعة معتمدة بالإضافة الى أطروحة وذلك لدرجة الماجستير .

كما تتعرض الورقة المقدمة الى مقومات البدأ فى مثل هذا البرنامج والإمكانيات الدنيا التى يجب توافرها له ومتطلبات وشروط القبول فيه . وتتضمن الورقة تقييما لتجربة جامعة الخليج العربى فى طرح هذا البرنامج وما يمكن الاستفادة فيه من خلال هذه التجربة.

٧- " تعميم خطه دراسية نموذجية لمنح شهادة البكالوريوس فى الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية " للدكتور حسين العمرى بكلية العلوم الصيدلانية والطبية بالجامعة الأهلية بعمان بالأردن .

يشهد العالم وهو يستقبل الألفية الثالثة ثورة علمية فى كافة مناحى الحياة ، ولعل من أهم العلوم التى جذبت اهتمام العلماء هو علم الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية حيث أصبح لها تطبيقات واسعة فى الحياة اليومية وأدخل استعمالها فى قطاعات خدمية وإنتاجية مختلفة مثل الصحة والصناعة والإنتاج الزراعى والحيوانى والإنتاج الدوائى ومكافحة التلوث البيئى والكشف عن الجرائم . إن زيادة الوعى بأهمية التكنولوجيا الحيوية قادت بعض الجامعات العالمية الى تدريس بعض المقررات فى خططها الدراسية . وعلى العكس فان المؤسسات التعليمية العربية لم تولى هذا المجال العلمى الجديد ، اهتماما يوازى أهميته الحالية لذا بات لزاما على القائمين على تطوير قطاع التعليم فى العالم العربى خصوصا فى الجامعات القيام بدور هام وأخذ زمام المبادرة وذلك بفتح روافد علمية لسد الحاجة المتزايدة الى كوادر متخصصة فى هذا المجال من العلوم . وبناء عليه فقد أصبح إنشاء قسم علمى يعنى بتخصص الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية ضرورة ملحة لعدم وجود مثل هذه الأقسام العلمية فى الجامعات العربية إلا فى حالات استثنائية وقليلة جدا .

أهداف الدراسة

إن هذه الورقة تقدم خطة دراسية نموذجية لقسم علمى يمنح الشهادة الجامعية الأولية (البكالوريوس) فى تخصص الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية .

الخطة الدراسية

اعتمد وضع الخطة الدراسية فى هذه الورقة نظام الساعات المعتمدة والمتبع فى معظم الجامعات العربية .

يبلغ مجموع الساعات المعتمدة فى هذه الخطة (١٣٠) ساعة تم توزيعها كما يلى :

١-متطلبات الجامعة بواقع (٢٤) ساعة معتمدة (١٥ ساعة اجبارية – ٩ ساعات اختيارية) .
٢-متطلبات الكلية بواقع (١٩) ساعة معتمدة (جميعها اجبارية) .
٣-متطلبات القسم بواقع (٨٧) ساعة معتمدة (٧٨ ساعة اجبارية – ٩ ساعات اختيارية) .

صممت الخطة بحيث يستطيع الطالب اتمام متطلباتها بمدة أربعة سنوات تقريبا. كما روعى فى تصميم الخطة أن تكون نسبة ساعات الدروس العلمية فى متطلبات القسم حوالى ٢٧% وتم تزويد كل مساق برقم خاص يبين فيه المستوى الذى يطرح فيه المساق (المرحلة الدراسية) والتخصص العلمي للمساق وتسلسله ضمن التخصص العلمي . كذلك فقد زودت الخطة بجداول استرشادية سنوية يهتدى بها الطالب عند تسجيله للمتطلبات الدراسية .

المناقشة والاستنتاجات

إن البرنامج الدراسى المقترح احتوى على ساعات معتمدة خاصة بمتطلبات الجامعة ومتطلبات الكلية ومتطلبات خاصة بالقسم وهذا يعطى مرونة البرنامج بحيث يمكن اجراء تعديلات عليه حسب طبيعة الجامعات وخصوصية الكليات التى يرتبط بها هذا القسم – كما رتبت المساقات فى هذه الخطة بشكل متسلسل حسب المراحل الدراسية بحيث يتم بناء وإعداد الطالب علميا بشكل انسيابى ومتدرج معتمدين على وجود المتطلب السابق أو المتزامن لكل مساق – لقد روعى فى إعداد البرنامج الدراسى تغطية كافة الجوانب التطبيقية لهذا التخصص بوصفه يمثل أحد حافات العلوم المتداخلة فيما بينها بحيث يؤهل الطالب من الناحية النظرية والعملية فى كافة علوم الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية تأهيلا جيدا للعمل كفنى فى كافة مجالات علوم البيولوجيا الحيوية . إن البرنامج المقترح يصلح أن يكون قسما علميا نموذجيا لإعداد الكوادر الفنية لسد الاحتياجات التى تبرز من خلال إدخال التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية الى حيز التطبيق فى المنطقة العربية حيث يمكن ان يرتبط القسم العلمى المقترح بأحد الكليات العملية مثل كليات العلوم ، العلوم الطبية، الزراعة أو أن يكون قسما أو مركزا أو معهدا علميا يرتبط بشكل مباشر برئاسة الجامعة . وبالتالى يساهم فى نقل التكنولوجيا من العالم الغربى المتطور الى المنطقة العربية.

٨- **" دراسة عن البيوتكنولوجيا وإنتاج نباتات مقاومة للملوحة "** للدكتور أحمد بهى الدين بكلية الزراعة جامعة عين شمس .

أشار سيادته الى أن معظم الأصناف النباتية المزروعة ذات أقارب برية ذات تحمل كبير للاجهادات غير الحيوية . تناولت المقالة علاقة الاجهاد البيئى بتراكم نواتج التمثيل فى النباتات الوعائية وغير الوعائية والطحالب والفطريات والبكتريا . أظهرت الدراسات الجزيئية أن الأنواع النباتية تعبر عن نفسها من خلال مجموعة من الجينات الشائعة والبروتينات عندما يحدث لها إجهاد (البروتينات المرتبطة Rab ، مجموعة بروتينات LEA والديهيدرينات) .

٩- " في المؤتمر الأول عن الغذاء والبيئة الذى عقد بكلية الزراعة جامعة الزقازيق يوم ٢٠٠٠/١٠/١٧ .

استمعت والحاضرين بمحاضرة شيقة وجريئة من أستاذى الفاضل أ٠د٠يحى محمد حسن أستاذ علوم الأغذية بكية الزراعة – جامعة عين شمس بعنوان " الأغذية المهندسة وراثيا وتغذية الإنسان " . لقد أثار العرض الشيق العديد من الاستفسارات والتساؤلات عن أمان هذه الأغذية المهندسة وراثيا وكان رأى أ٠د٠ يحى أنه لا خوف ولا خطورة لأن كل شيء مقنن ومدروس ولكنى اختلفت مع سيادته فانه لا أمان مطلق لأية تكنولوجيات جديدة حيث الأمان نسبى وكل حذر مرتبط بالسمية الأساسية (البصمة) والتعرض . حتى لا أفسد المتعة والاستمتاع سأضع ملخص المحاضرة كما هو :

يواجه الجنس البشرى تحديات خطيرة ومتتابعة خلال السنوات المقبلة تتمثل فى :

١-الزيادة المضطردة فى أعداد السكان (حيث سيصل نحو ١٠ بليون إنسان عام ٢٠٢٥٠٠) .

٢-انخفاض الدخل السنوى للفرد فى كثير من الدول (حيث يبلغ عدد الذين يعيشون على دخل أقل من دولار واحد / يوم نحو ١٢٠٠٠٠٠٠٠٠ إنسان) .

٣-٨٠٠ مليون إنسانا يعانون من الجوع حاليا ومنهم نحو ٥٠٠ مليون إنسان يعانون من سوء التغذية الشديد – ومعظم هذا العدد (نحو ٧٥%) يعيشون فى أفريقيا وجنوب آسيا .

٤-كذلك فان انتقال السكان من الريف الى الحضر يمثل ظاهرة خطيرة أخرى من حيث المجهود الذى يبذل لتوفير المأكل لهم داخل المدن ولانقطاع الصلة بالإنتاج الزراعى .

٥-من التحديات الخطيرة الأخرى هى نقص المياه بما أصبح يهدد بما يعرف بحرب المياه وكذلك انخفاض إنتاجية الأرض الزراعية وتدهور صفاتها فى مناطق كثيرة وكذلك النقص المتواصل فى مساحة الغابات والانحدار البيئى فى شواطيء العالم ومصادر الصيد السمكى .

يبذل المتخصصون بالإنتاج الزراعى والغذائى جهودا مضنية لمواجهة هذه التحديات بالسير فى محاور فى وقت واحد .

- محور الإنتاج الزراعى (الإنتاج الحالى – والإنتاج المستقبلى) .

- محور السياسات العامة (توعية المواطنين لأخطار الانفجار السكانى – منع أو تقليل الهجرة من الريف الى الحضر – ترشيد الاستهلاك) .

ويتدرج تحت بند الإنتاج المستقبلى الهدف الرئيسى الذى تغطيه هـذه المحاضرة العامة وهو " البحث عن مصادر جديدة – وصور جديدة – وطرق جديدة لكل ما له علاقة بالإنتاج الزراعى الغذائى " وهو ما يمثل الأمل الذى يراود علماء الزراعة وتكنولوجيا الأغذية بالبحث فى مجال الهندسة الوراثية كمحاولة لمواجهة شبح الجوع .

يعتبر مصطلح التكنولوجيا الحيوية للغذاء – والذى يندرج تحته تكنولوجيا الهندسة الوراثية أو التعديل الوراثي من الموضوعات التى تثير الكثير من الجدل – وقد تعددت الأراء وجميعها تبنى على توقعات – بعضها يؤيد وبعضها يعارض .

ولكن نظرا لأن المعارضون يثيرون اعتراضاتهم على أساس الخطورة المحتملة على صحة الإنسان – فأن اعتراضاتهم تلقى آذانا تسمع وتشكك وسيستمر هذا الشك الى أن يثبت يقينا سلامة مثل هذا الغذاء ...

باستعراض موقف الأطراف المختلفة نجد تباينا فى الآراء .. فالبعض يرفض رفضا قاطعا استخدام المحاصيل المعدلة وراثيا فى تغذية الإنسان ومن الأمثلة على ذلك ما نشره الأمير شارلز ولى عهد بريطانيا عام ١٩٩٨ فى جريدة الديلى تليجراف وأطلق على بذور تلك المحاصيل باسم " بذور الكارثة " ولخص رأيه فى أن ذلك يعتبر عملا لا أخلاقيا ويعتبره تدخلا فى إرادة الله الذى خلق التراكيب الوراثية للمحاصيل بالوضع الذى هى عليه ومن ثم يجب على الإنسان ألا يسعى لتغييرها – وحذر من أن مثل هذه المحاولات فى تغيير التراكيب الوراثية والتى قد تبدو أنها لتحقيق غرض مطلوب فان مثل هذه التغييرات قد تسبب أضرار مستقبلية وأنه قد تكون هناك احتمالات غير مرئية .

كما نشطت بعض وسائل الاعلام من صحف يومية ومجلات أسبوعية فى نشر المقالات التى تعارض أو تشكك فى هذه الطريقة .

ولكن البعض الآخر يؤيد طريقة اللجوء للهندسة الوراثية على أساس أنه تعديل فى التركيب الوراثى من المفروض أنه يخضع لتكنولوجيا متقدمة تضمن إدخال الصفة المرغوبة فقط من داخل تراكيب مختلفة لا تربطها ببعضها البعض أية قرابة وذلك على عكس أساليب التربية والتهجين التى كانت متبعة فى الماضى والتى تدخل الصفات المرغوبة بتزاوج الأقرباء والتى قد تسبب دخول صفات أخرى غير مرغوبة .

باستعراض الموقف حاليا نجد أن هناك العديد من المنتجات الغذائية التي يعتمد إنتاجها التجارى على التعديل الوراثي فيما يلى :

١- فول الصويا

ثبت علميا إن زراعة فول الصويا المقاوم لمبيدات الحشائش ساعد على زيادة الإنتاج دون تغيير فى صفاته الغذائية ودرجة الأمان – وقد وافقت مجموعة دول الاتحاد الأوربى فى ابريل ١٩٩٦ على استيراد هذا المنتج ودخوله فى الصناعة اعتمادا على الحقائق التالية :

١-ليس هناك ما يبرر التفرقة بين فول الصويا المعدل وراثيا لمقاومة مبيدات الحشائش وفول الصويا العادى .
٢-ليس هناك ما يبرر الاعتقاد باحتمالات أى أضرار على صحة الإنسان أو على البيئة من زراعة هذا المنتج .
٣-ليس هناك ما يبرر ضرورة وضع بيانات واضحة على بطاقة العبوات بأن هذا المنتج محضر من فول صويا معدل وراثيا .

وقد زادت المساحات المزروعة من فول الصويا المعدل وراثيا لدرجة أن شركة مونسانتو الأمريكية قد انتجت تقاوى لزراعة ١٠ مليون فدان عام ١٩٩٨ واستخدمت جميعها فى الزراعة وكانت هناك مطالبات بكميات إضافية من التقاوى لم تتمكن الشركة من تلبيتها فى حينه :

٢- سمحت العديد من الدول بإنتاج محاصيل غذائية معدلة وراثيا بخلاف الفول الصويا مثل :

اسم المحصول	الدول التى تصرح وتاريخ التصريح
الذرة	أمريكا ١٩٩٥ ، كندا ١٩٩٦ ، اليابان ١٩٩٦
القطن	أمريكا وكندا ١٩٩٥ – المكسيك ١٩٩٦
البطاطس	أمريكا ١٩٩٤ – كندا ١٩٩٥ – اليابان ١٩٩٦ – المكسيك ١٩٩٦
الكانيولا	كندا ١٩٩٥ – أمريكا واليابان والمكسيك وانجلترا ١٩٩٦
الطماطم	أمريكا ١٩٩٤ – كندا ١٩٩٥ – انجلترا ١٩٩٦ – المكسيك ١٩٩٥

٤-صرحت إدارة التغذية والعقاقير الأمريكية عام ١٩٩٣ باستخدام هرمون النمو BGH وهو النسخة المهندسة وراثيا للهرمون الطبيعى الذى تفرزه الأبقار لتنشيط افراز اللبن – وقد تعرض استخدام هذا الهرمون لانتقادات شديدة مما

حدي بدول الاتحاد الأوربى وكندا لمنع استخدامه بينما تشترط أمريكا ضرورة وضع بطاقة على الألبان المنتجة من أبقار معالجة بهذا الهرمون توضح الأخطار المرضية المحتمل حدوثها للمستهلك .

إضافة الى ما سبق فان هناك مجالات عديدة ومبشرة ستدخل قريبا فى تغذية الإنسان ومنها :

أ – إنتاج التوماتين وهو جزىء بروتينى شديد الحلاوة (حوالى ٢٥٠٠ – ٣٠٠٠ مرة قدر حلاوة السكروز) ويعزل الجين المشفر للتوماتين من نبات الكاتيمف وإيلاجه فى ميكروبات تقوم بإنتاجه بكميات تسويقية مثل الطماطم (وتقوم إحدى الشركات حاليا بتحضيره تجاريا تحت اسم " تالين ") . كما تجرى محاولات إيلاجه فى الكاكاو بما يسمح بإنتاج مشروب كاكاو حلو دون إضافة سكر سواء للشرب أو لصناعة الشيكولاتة كذلك تجرى محاولات لإدخال هذا الجين فى ثمار الكانتالوب للحصول على صفات حلاوة ثابتة بدلا من احتكار بعض الشركات لأصناف التقاوى المرغوبة مثل ما هو معروف حاليا فى صنف "جالينا" –وكذلك إعادة النشاط الزراعة لإنتاج الشمام فى مصر .

ب– تم العثور على جين بإحدى سلالات العنب يعطل عملية تحويل انزيم البوليفينول اكسيديز الخاملة الى صورة نشطة وبالتالى يطيل من فترة عرض الخضراوات القابلة لسرعة تغيير لونها (الـ Browning) .

ج– تجرى حاليا محاولات لوقف عمل الجينات المشفرة للانزيمات التى تحلل جدر الخلايا وتهضمها وبالتالى إنتاج سلالات من الخضراوات مثل الطماطم تبقى معروضة بالأسواق على درجة حرارة الغرفة لمدة طويلة دون أن تتعرض للعطب السريع .

د – التوسع فى إنتاج الكيموسين (الرينين) المستخدم فى صناعات الجبن لمواجهة الطلب المتزايد على هذا الانزيم مع النقص فى أعداد العجول المذبوحة – إضافة الى خلو المنتج المحضر بالهندسة الوراثية من شوائب الببسين الذى يسبب الطعم المر – مع ملاحظة أن إنتاج هذا الانزيم بأساليب الهندسة الوراثية مصرح به فى سويسرا منذ عام ١٩٨٨ وفى أمريكا منذ عام ١٩٩٠ – وكذلك فى انجلترا وأيرلندا وألمانيا .

هـ– نجحت محاولات إنتاج انزيم جلوكوز ايزوميريز بالهندسة الوراثية لاستعماله فى تحويل النشا لى شراب عالى الفركتوز ذو حلاوة مرتفعة نسبيا وأرخص من ثمن السكروز – ويتم إنتاجه تجاريا من أنواع متعددة من البكتريا والخميرة .

و – أعطت الهندسة الوراثية نتائج جيدة فى إنتاج بادئات الصناعات اللبنية لتحقيق أغراض هامة مثل :

- إنتاج بادئات مقاومة للإصابة بالبكتريوفاج .
- إنتاج سلالات ذات نشاط عالى فى تحليل البروتين لتطوير نكهة الجبن .
- إنتاج سلالات ذات القدرة على إنتاج المضادات الحيوية (اليكتريوسينات) .

ز – تم كذلك تطوير سلالات ميكروبية لإنتاج أحماض عضوية مثل زيادة إنتاج حمض الستريك بنحو ٣٠ ضعفا أكثر من الطرق التقليدية وذلك بكلونة الجين الحامل لصفة إنتاج انزيم Phospho-Fructo-Kinase وأنزيم Phrovate – Kinase فى فطر Aspergillus – niger . كما تم كلونة جين انزيم الفا أميليز فى بكتريا باسيللوس ستياروثيرموفيلس لتعمل على النشا وتنتج حمض اللكتيك .

ح – إضافة الى ما سبق فأنه يجرى حاليا استخدام أساليب الهندسة الوراثية فى إنتاج بعض المواد المضافة للأغذية Food Additives مثل التوماتين السابق الإشارة اليه – أو إيجاد صفة إنتاج الحمض الامينى لايسين والحمض الامينى تربتوفان فى الذرة – أو فيتامين أ والحديد فى الأرز أو مركبات النكهة والرائحة المختلفة .

ط– نجحت محاولات تحسين صفات خميرة الخباز باستخدام أساليب الهندسة الوراثية بإنتاج خميرة متعددة الفوائد تعمل على سكر السكروز وفى نفس الوقت على سكر المالتوز حسب نوع العجينة مع زيادة فى إنتاج غاز ثانى أكسيد الكربون وكذلك إنتاج خميرة ذات مستوى عالى من التريهالوز لحمايتها من الظروف التى تتعرض لها مثل التجفيف أو التجميد أو الضغط الاسموزى المرتفع .

ى – تم تنشيط إنتاج انزيم تجاريا ليمرر عليه اللبن فيعمل على تحلل سريع لسكر اللاكتوز وبالتالى يساعد الأشخاص الذين يتعرضون لمتاعب صحية عند شرب اللبن العادى.

ك – إضافة لكل ما سبق فان هناك استعمالات غذائية لعديد من المنتجات اعتمادا على أساليب الهندسة الوراثية مثل :

- إيلاج البروتين المشفر لبروتين GAD فى نبات البطاطس وذلك لاستعمالها فى تغذية مرضى السكر – ويعتقد البعض أن مثل هذه البطاطس الغنية بهذا البروتين تساعد فى منع طرد الجسم الأدمى لأى أجزاء مزروعة فيه .

- تم نجاح إنتاج انسولين يشبه الانسولين البشرى تماما ويستعمل بنجاح حاليا لمرضى السكر تحت أسم Humulin .

- تم إنتاج بطاطس وطماطم فاكسينات مضادة للإسهال والسعال الديكى والالتهاب الكبدى الوبائى (سلالة B) وتسوس الأسنان .

ل – وفى مجال الإنتاج الحيوانى – فقد نجحت معامل أبحاث المركز العالمى للأسماك ICLARM فى إنتاج سلالة من أسماك البلطى تتميز بسرعة النمو وجارى حاليا نشر هذه السلالة (GIFT) فى بلدان جنوب شرق آسيا والفلبين .

ما سبق كان عرضا لبعض أوجه استخدام الأغذية المهندسة وراثيا (المعدلة وراثيا) فى تغذية الإنسان ولا يعيب نشر هذه المنتجات على المستوى التجارى والتسويقى سوى احتكار الشركات وحقوق الملكية وبراءات الاختراع مما يوجب علينا السير فى موكب التقدم العلمي وعدم انتظار نتائج دراسات المراكز البحثية الأخرى .

وقد أحسنت وزارة الزراعة المصرية بإنشاء معهد بحوث الهندسة الوراثية وتشجيع معامل البحوث بالجامعات والأكاديمية للخوض فى هذا المضمار حتى يمكن أن يساير التقدم العلمى .

١٠– فى رسالة دكتوراه العلوم الزراعية للطالب / محمد مصطفى محمد ابراهيم من كلية الزراعة جامعة عين شمس بعنوان " دراسات وراثية جزيئية على الانحلال الحيوى لبعض الملوثات البيئة بواسطة بعض الطحالب الخضراء المزرقة تحت إشراف أ٠د٠ على زين العابدين عبد السلام ، أ٠د٠ سمير عبد العزيز ابراهيم أساتذة الوراثة بكلية الزراعة جامعة عين شمس . لقد آثرت أن أضع ملخص الرسالة فيما يلى :

تعتبر بحيرة قارون بمحافظة الفيوم من البحيرات التى لها أهمية اقتصادية فى مصر حيث تعتبر من أكبر البحيرات السمكية فى مصر بالإضافة الى أهميتها كمصدر للجذب السياحى . إلا أن هذه الأهمية قد قلت فى الفترة القليلة الماضية بسبب تسرب مياه الصرف الزراعى الصناعى إليها وهو ما أدى الى القضاء على نسبة كبيرة من الأسماك بصورة مباشرة وبصورة غير مباشرة من خلال القضاء على الطحالب التى تتغذى عليها هذه الأسماك .

ولهذا السبب فقد اتجهت الأنظار الى البحث عن وسائل فعالة وآمنة واقتصادية لتنظيف مياه البحيرة لكى تستعيد مرة أخرى مكانتها وأهميتها الاقتصادية . وفى هذا الصدد يعتبر التكبير الحيوى للملوثات العضوية من أهم الوسائل المستخدمة فى هذا المجال .

ولذلك فقد اهتم هذا البحث بإجراء دراسات بيوكيميائية ووراثية جزيئية على بعض سلالات الطحالب الخضراء المزرقة التى أظهرت متباينة على تحمل وتكسير الليندان وذلك باستخدام تقنية الفصل الكهربى للبروتينات SDS-PAGE بالإضافة الى تقنية العشوائى للقطع المتباينة من المادة الوراثية والتى تعرف بـ RAPD-PCR . كما تم إجراء مقارنة على المستوى البيوكيماوى والجزيئى بين السلالات محل الدراسة وذلك بالإضافة الى محاولة عزل كل من الجين المسئول عن الخطوة الأولى فى سلسلة التفاعل الخاصة بتكسير مبيد الليندان والمعروف بجين LinA وكذلك البروتين الذى يشفر له والمعروف ببروتين LinA والمعزولين من سلالة للبكتيريا من النوع Pseudomonas paucimobillis UT26 ذلك بغرض المقارنة بين ميكانيكية تكسير تلك الليندان فى كل من الطحالب الخضراء المزرقة وتلك السلالة .

تم جمع عينات الطحالب الخضراء المزرقة من عدد من الأماكن الملوثة بالبحيرة حيث تم عزل وتنمية وتسمية سبع عزلات تمثل أربعة أجناس مختلفة بنجاح تحت ظروف المعمل اعتمادا على أشكالها المظهرية وطبيعة نموها . كما تمت عملية تنقية السلالات باستخدام طريقتين من طرق التنقية . تعتمد الطريقة الأولى على إستجابة الطحالب الخضراء المزرقة للضوء بينما تعتمد الطريقة الأخرى (وهى الطريقة التى تم ابتكارها وتطبيقها بنجاح فى هذا البحث) على إجراء عملية نزع للغلاف المخاطى المحيط بالخلايا وذلك بوسيلة انزيمية ثم ميكانيكية .

تم إجراء اختبار لقدرة هذه العزلات على تحمل تركيزات متدرجة من مبيد الليندان. وذلك بتحضينها معه لمدة أربعة أسابيع مع أخذ قراءات المحتوى الكلوروفيللى للخلايا على فترات متساوية (كل أسبوع) . وقد أظهرت نتائج تلك التجربة أن كل العزلات كانت متحملة لتركيزات الليندان (١ و ٥ و ١٠ جزء فى المليون) خلال أول أسبوعين أما فى الأسبوعين التاليين فقد تأثرت الخمسة عزلات (ACGEB 12.22.23,24,25) تأثرا سلبيا بينما ظلت العزلتين الباقيتين وهما (ACGEB 19 ACGEB 14) متحملتين .

بعد ذلك تم اختبار قدرة هذه العزلات على تكسير الليندان باستخدام جهاز الفصل الكروماتوجرافى . حيث أظهرت نتائج هذه التجربة أن العزلات محل الدراسة لديها قدرات متباينة على تكسير الليندان كما أظهر تحليل الطيف الكتلى أن نواتج تكسير الليندان عبارة عن خليط من مشابهات المركب العضوى (البنزين) .

تم إجراء تعريف لهذه العزلات على المستوى البيوكيماوى والجزيئى وذلك باستخدام تقنية الفصل الكهربى للبروتينات SDS-PAGE وذلك باستخدام التركيزين ١٢% ، ١٥%

بالإضافة الى تقنية التكبير العشوائى للقطع المتباينة من المادة الوراثية والتى تعــرف بــ RAPD – PCR . وذلك باستخدام سبع بادئات هــم UBC2 , UBC3 , UBC4 , UBC5 , UBC6 , UBC7 , UBC9 وذلك بهدف التأكد من صحــة التسمية المبدئيــة والتى تمت على أساس الشكل المظهرى فقط بصورة مبدئية الى أربع أجناس مختلفة .

وقد أظهر التحليل الاحصائي لنتائج هذه التجارب ان تلك العــزلات السـبعة تتبـع بالفعل أربعة مجاميع متباينة . كما أظهرت نتائج تلك التجربة أنه يوجد عدد كبير من الحزم الوراثية المعلمة (سواء الحزم البروتينية أو حزم الأحماض النووية) وهو ما قد يفيد فـي تمييز وتعليم السلالات محل الدراسة كما أنه يفيد فى تحديد درجة القرابة بين تلك السلالات. وقد كان أكبر عدد من تلك الحزم من استخدام البادىء (UBC7) وكذلــك مــن اســتخدام التفريد الكهربى لحزم البروتينات 12% SDS-PAGE حيث نتج من كل منهما ١٤ حزمــة معلمة . بينما كانت أقل وسائل التعريف البيوكيماوى والجزيئى الوراثى إنتاجا لهذه الحـــزم المعلمة هو استخدام 15% SDS-PAGE حيث نتج منها حزمة معلمة واحدة .

كما أظهرت النتائج أن العزلتين اللتين تأثرتا بصورة إيجابية نتيجة المعاملــة بمبيـد البيدان قد اشتركتا فى عدد من الحزم المعلمة حيث قد يكون من المحتمل وجود علاقة بيــن تلك الحزم وبين النشاط التحملى لهاتين العزلتين .

وقد كانت أفضل وسيلة للتعريف الوراثى البيوكيماوى الجزيئى للعزلة ACGEB12 هو أحد البوادىء UBC 4,6,9 وكذلك استخدام 15% SDS-PAGE . اما بالنسبة للعزلــة ACGEB14 فان أفضل وسيلة للتعريف الوراثى البيوكيماوى الجزيئـــى لــها هــو أحــد البوادىء UBC 2,4,6 إضافة الى استخدام تقنيــة 12% SDS-PAGE . أمــا العزلــة ACGEB19 فقد كان أفضل وسيلة للتعريف الوراثى لها هو استخدام تقنيـــة 12%SDS-PAGE وكذلك البادىء UBC4 أما العزلة ACGEB23 فان أفضل وسائل تعريفها وراثيا هو استخدام البادىء UBC7 . وبالنسبة للعزلة ACGEB22 فان أفضل وسيلة للتعريـــف الوراثى البيوكيماوى الجزيئى لها هو استخدام البادىء UBC4 . أما أفضل بادىء للعزلـــة ACGEB24 فهو البادىء UBC5 وأخيراً فان أفضل وسيلة للعزلـــة ACGEB25 هـــو التعريف الوراثى باستخدام تقنية 12%SDS-PAGE .

تم أيضا إجراء محاولات لعزل الجين المسئول عن عملية التكسير فى السلالات التى أظهرت القدرة الطبيعية على التكسير حيث أوضحت نتائج هذه التجربة أن ميكانيكية عمليــة التكسير في البكتريا من النوع Pseudomonas pucimobillis UT26 قد تختلــف عــن تلك الموجودة فى السلالات محل الدراسة .

١١- في كتاب " ثورة الهندسة الوراثية " للدكتور زيدان السيد عبد العال - العالم الكبير بكلية الزراعة جامعة الإسكندرية والصادر عن منشأة المعارف بالإسكندرية قام سيادته باستعراض ثلاثة نماذج عن إنجازات التكنولوجيا الحيوية في إسرائيل والهند والصين آملا أن تكون هاديا لنا في مصر حتى تعظم البرنامج القومي في هذا المجال الحتمي الذي لا سبيل غيره لكي يعبر بنا وبأمان الى القرن الواحد والعشرين كي نخفف عن كاهل الغلابة والعامة من غولاء الجوع والعطش والمشاكل البيئية الطاحنة . ناهيك عن التفوق البشرى والمصلحة والعلاقة الوطيدة بين إسرائيل وأمريكا فان التكنولوجيا الحيوية خطت خطوات واسعة في هذه البلدة الطاغية منذ ١٩٧٨ بدأت بثلاثة شركات والآن وصلت الى ١٥٠ شركة معظمها قطاع خاص أي استثمار . الاتجاهات الرئيسية في اتجاه الحصول على أدوية نظيفة وتشخيص أمراض الإنسان والعلاج بالجينات وتشخيص أمراض النباتات والكشف عن التلوث البيئي وإنتاج محاصيل ذات طفرة في الكم والنوع . كذلك توجه العديد من الدراسات والبحوث على غول السرطان والكشف المبكر والعلاج ومرض الزهايمر . المنتجات الزراعية المهندسة وراثيا أصبحت تمثل دخل كبير جدا للخزانة الاسرائيلية (قاربت على ٣٠٠ مليون دولار إن لم تزيد) . هناك شركة إسرائيلية تقوم بعمل ليبوسوم كبديل لمحلول ملحي يستخدم في تغذية الأسماك . من الدراسات المبشرة جدا ما يتعلق بالأجسام المضادة الأحادية التي تختبر كيفية قيام الممرض بإنتاج الحامض النووى "الدنا" المغلف بوسطة الجاما انترفيرون ، IL-2 بما يمكن من التعرف على احتمالات عودة سرطان المثانة واللوكيميا . لقد نجح العلماء بجامعة رهوفوت بإنتاج نباتات مهندسة وراثيا تقاوم الفيروس وتتحمل الجفاف وإنتاج فطر الترايكودرما لمنع مرض الشلل وموت البادرات والذى يكافح ويقاوم بالعديد من المبيدات .

لقد قارب تعداد الهند مليار إنسان لابد من توفير الغذاء ومتطلبات الحياة الأخرى لهم جنبا الى جنب مع برنامج تنظيم الأسرة الذى لابد وأن يلقى ويأخذ نصيبا من التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية . لقد دخلت الهند في ثورتان الأولى " الثورة الخضراء " والثانية ثورة التكنولوجيا الحيوية " لتوفير الغذاء لطوفان البشر في أراضيها . من الإنجازات الهندية تطويع برنامج زراعة الأنسجة وهي تكنولوجيا غير متقدمة في الحصول على نباتات زينة خالية من الأمراض للتصدير خاصة الى هولندا (القرنفل وفك السبع والجرانيوم > ١٠٠ مليون نبات) وكذلك إنتاج نباتات الموز والفلفل بالتعاون مع شركات هولندية تشترى الإنتاج . حققت الهند نجاحات هائلة في إكثار خشب الصندل والكافور والبامبو والمانجو والرمان وشجرة النيم . كما لو كانت شجر النيم مقدسة أقامت الهند مفاعلات حيوية Bioreactor لإكثارها بهدف الحصول على العديد من المواد الصيدلانية . من النجاحات

المذهلة قيام المعاهد العلمية باستخدام وسائل الهندسة الوراثية فى عمل مجاميع للكشف عن المرضية فى الإنسان والحيوان وغيرها . كل ذلك صاحب إدخال مقررات للتكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية فى كل مراحل التعليم الثانوى والجامعى والدراسات العليا . تقوم الشركات الهندية (قطاع خاص) بتطوير الحصول على قطن وخضراوات مهندسة وراثيا تقاوم الحشرات والأمراض وكذلك هندسة دودة الحرير وفول المانج والبقوليات والكرنب عقيم الذكور . نجحت الهند فى إنتاج الانزيمات القاطعة للحامض النووى (DNA) وإعادة تركيبه وحدث نفس الشيء مع ناقل هذا الحامض DNA vector الذى يحمل الحامض الى الكائن المطلوب هندسته وتحويله وراثيا . الهند يا سادة تنفق سنويا ما يزيد عن العشرة مليون دولار أمريكى على بحوث التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية بالإضافة الى أضاف هذا المبلغ من خلال المنح الأجنبية ... ثم نتكلم عن التكنولوجيا الحيوية فى مصر.

دخلت الصين عصر التكنولوجيا الحيوية فى بداية السبعينيات من خلال اقترابات زراعة الأنسجة والخلايا النباتية تحت ما يعرف بزراعة الميكروسبور والذي أدى الى إنتاج دخان وأرز وقمح عن هذا الطريق ثم سرت السنوات وملاحقة انجازات مع الخضر والفاكهة ونباتات الزينة والنباتات الطبية ثم البطيخ الثلاثى الخام من البذور ثم الموز والبطاطس والفراولة والثوم الخالية من الأمراض الفيروسية . لقد زادت إنتاجية البطاطس المهندسة وراثيا بمقدار ١٠٠ – ٢٠% عن الأصناف العادية . أدت التكنولوجيا الحيوية الى تقصير فترة إكثار قصب السكر الى ٤ سنوات بدلا من عشرة . لقد كانت الصين أول دولة فى العالم تحصل على قمح شتوى جديد ناتج من زراعة المنك على مستوى العالم .

ماذا يعنى هذه النجاحات لمصر ؟ لابد أن نضع ونحدد وبوضوح خطتنا وأهدافنا من إدخال التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية . لابد من رصد مبالغ كافية لوضع عجلة البحث العلمى فى هذا الاتجاه . لابد من دخول القطاع الخاص باستثمارات ضخمة فى هذا المجال . لابد من وضع برنامج قوى للإرشاد وتوضيح أمان هذه المنتجات . يوجد عندنا معهد الهندسة الوراثية الزراعية التابع لوزارة الزراعة وهو الأمل وفى الجامعات مراكز مماثلة لا أعتقد انه سيكون لها مردودات محسوسة فى التكنولوجيا الحيوية إلا من خلال الرسائل العلمية إن أمكن توفير متطلباتها وكذلك أكاديمية البحث العلمى ونحن نتطلع الى إيجاد دور متكامل لهذه الهيئات والمؤسسات لعلنا نصل الى تحقق الأهداف المنوطة بإطعام ٦٥ مليون مصرى والحصول على وسائل جيدة لتشخيص الأمراض النباتية والبشرية وإيجاد مقاومة للآفات . إن مشاكلنا كثيرة واحتياجاتنا من هذه التكنولوجيا كثيرة أيضا . لقد تحققت بعض النجاحات من خلال برامج التربية العادية فى إيجاد أصناف ذات إنتاجية عالية تقاوم بعض ظروف الإجهاد البيئى وإنتاج بكتريا Bt ضد الحشرات حرشفية الأجنحة

خاصة دودة ورق القطن لكننا مازلنا فى المراحل الأولى فى تطبيقات التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية بما يتمشى مع الأهداف .

فى هذا السبيل وحتى تكون خطواتنا محسوبة ولا ندخل فى الشطط والمكابرة نشير الى التجربة الأمريكية فى التركيز على النباتات المهندسة وراثيا التى تنتج بروتينات ذات خواص إبادية على الآفات كما هو الحال مع إدخال جين مبرمج لبروتين له خواص المبيد ددت (دى-انوتوكسين) والذي أخذ من بكتريا Bt بالسيلليس ثرونجينسيز فى النباتات مما يجعلها مقاومة لحشرات حرشفية الأجنحة مثل دودة ورق القطن وديدان اللوز . لقد تمكن معهد بحوث الهندسة الوراثية فى مصر من عزل وأقلمة سلالة فعالة من هذه البكتريا ثم جهز مستحضر تجارى منها تحت الاسم "اجرين" وقد أثبت كفاءة عالية فى المعمل وفى الحقل ضد الأعمار الصغيرة من دودة ورق القطن . يقول بعض الزملاء أن لهذا المستحضر البكتيرى تأثير فعال على بيض ورق القطن . يتم تقييم كفاءة البروتينات ضد الآفات إما مباشرة كما فى مثبط الأميليز ، الكثينات ، مثبط البروتينيز ، Bt أو بالتقييم العشوائى وغير المباشر لزراعة الميكروبات أو بروتين ما . لقد أمكن من خلال هذه الطريقة الحصول على بروتين له صفات المبيدات مثل الكوليستيرول أكسيديز من مزارع الأستربتومايسيس . تجدر الإشارة الى ظهور سلالات حشرات مقاومة لبكتريا Bt بما فيها من بروتين وقد أدت البحوث الى اكتشاف بروتين Cry11 وهو قاتل للحشرات المقاومة لمستحضر Bt وهو يرتبط ببروتين معين موجود فى خلايا أغشية معدة الحشرة وبعد الارتباط يحدث ثقوب فى الغشاء ويسمح بعمل خلل فى نفاذية غشاء معدة الحشرة مما يؤدى الى فقد الخلايا لمحتوياتها. لقد تم الكشف عن نوعين من البروتينات فعالة ضد حشرات من الخوخ تحدث نقص فى السكر مثل بروتينات الانفرتيز والهكوسيل ترانسفيريز .

من النجاحات التى تحققت على مستوى العالم فى التكنولوجيا الحيوية الزراعية ما حدث مع الذرة حيث تمكنت شركة مونسانتو بالحصول على ذرة مقاومة للحشرات. والآخر مقاوم لمبيدات الحشائش (شركة أجريفو) وصنف آخر مقاوم للحشرات ومبيدات الحشائش معا (شركة نوفارتس) وكذلك إنتاج حبوب وبقوليات غنية فى البروتين وحبوب بن قهوة خالية من الكافين وفراولة بها سكر طبيعى وبطاطس لا تتشرب زيت التحمير وموز به لقاح ضد التهاب الكبد الوبائى وطماطم بها بروتين يقلل من كمية الكوليستيرول . علي الجانب الآخر هناك خوف من منتجات الهندسة الوراثية خاصة فى دول الاتحاد الأوربى مثل :

١-احتمالات حدوث تلقيح بين النباتات المهندسة وراثيا والحشائش البرية مما يؤدى الى إنتاج حشائش عملاقة .

٢-ظهور حشرات مقاومة للجين المسئول عن المقاومة للحشرات .

٣-احتمال قتل الحشرات النافعة .

٤-إنتاج كائنات دقيقة تقاوم المضادات الحيوية فى المستقبل .

٥-إيجاد مرض الحساسية .

يؤكد العديد من البحاث والهيئات العلمية على أمان منتجات الهندسة الوراثية علـــى الصحة والبيئة حيث تتعرض لدراسات من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكيـــة (FDA) . الحقيقة أننى غير متفائل كثيرا بهذا الأمان لأن أى تغير عن الحالة الطبيعية لابد وأن يكـــون مصحوبا بتأثيرات جانبية ضارة حتى لو كان الضرر غير محسوس على المدى القريـــب أو البعيد . أقصد بعد وجود أمان مطلق حيث الأمان نسبى . يا ســـادة التكنولوجيـــا المتقدمـــة تحتاج لكفاءات علمية على أعلى مستوى وبنية أساسية متقدمة ويجب ان تنبع هذه الوســـيلة من معاملنا ولا نعتمد على الاستيراد من الخارج . لا داعى للكلام المثير للاحباط وتعميـــق أننا متخلفون بمراحل كبيرة عن الدول المتقدمة . نحن بصدد تكنولوجيات جديدة عندنا كـــل مقوماتها ولا نحتاج سوى خطة على المستوى القومى خلافا لمـــا يحـــدث الآن ... نحـــن لانهاجم أحدا ولكن يجب وضع الأمور فى نصابها الصحيح لأننا بصـــدد معرفـــة متعـــددة الجوانب .

الفصل الثالث

نماذج مختارة من الدراسات المصرية عن الأدلة الوراثية فى النباتات التى تقاوم الظروف البيئية المعاكسة والآفات

بعد أن أنهيت الفصل الثانى عن التكنولوجيا الحيوية والاجـــهادات علـــى النباتـــات تساءلت أين نحن فى كليات الزراعة ومراكز البحث العلمى من هذه الاتجاهات التـــى تقـــع تحت مظلة التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية . للإجابة على هذه الخواطر توجهت الـــى مكتبة كلية الزراعة جامعة عين شمس وأطلعت على الرسائل التى أجيزت فى عـــام ٢٠٠٠ من قسم الوراثة تحت اشراف الزملاء الأفاضل بالقسم وهم أساتذة مشـــهود لـــهم بالكفـــاءة والنشاط وتجاوز الحدود الاقليمية ووجدت بغيتى فى سبعة رسائل آثرت أن أضعها بين يدى القارىء الكريم . كلفت أحد البحاث الذين يدرسون معى فى التوكسيكولوجيا البيئية بجمع مـــا أجيز من دراسات خاصة بالتكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية بكليـــة الزراعـــة جامعـــة القاهرة وقررت أن أعرضها فى هذا الفصل من الكتاب وكان توجهى الثـــالث الـــى معـــهد بحوث الهندسة الوراثية بيت الأسرة الكبير فى هذا الشأن ومازلت أبحث حتى كتابـــة هـــذه الصفحات عن المزيد . حمدا لله سبحانه وتعالى أننا نسير على نفس النهج والخط على أعلى مستوى مع الدول المتقدمة ولكن ما ينقصنا هو الاستفادة من نتائج هذه الدراسات التى أخذت الوقت والجهد والأموال من مقدرات شعب مصر العظيم .

١- استنباط أدلة وراثية جزيئية لمقاومة الجفاف فى بعض سلالات وهجن الذرة الشامية

للسيد / أسامة مصلحى صالح مصطفى للحصول على درجة الماجستير مـــن كليـــة الزراعة جامعة عين شمس (وراثة) عام ١٩٩٨ تحت إشراف أ٠د٠ فتحى محمد عبد التواب ، د٠ إيمان محمود فهمى ، د٠ احمد بهى الدين محمد بقسم الوراثة بالكلية .

أجريت هذه الدراسة فى المزرعة الحقلية وصوب معملية ومعامل قسم الوراثـــة – كلية الزراعة – جامعة عين شمس – شبرا الخيمة خلال الفـــترة مـــن ١٩٩٤ – ١٩٩٨ ، وذلك لدراسة الأساس الوراثى والجزيئى لتحمل الجفاف فى بعض سلالات وهجـــن الـــذرة الشامية وكانت النتائج المتحصل عليها كالاتى :

١-من خلال التجربة المبدئية فى الحقل على ١٨ سلالة من الذرة الشامية تم اختيار سلالتين أحدهما متحملـــة للجفـــاف (G621W) والثانيـــة حساســـة للجفـــاف (G603W) .

٢-تم إجراء التهجين بين هاتين السلالتين للحصول على الجيل الأول ثم عمل التلقيح الذاتى للجيل الأول للحصول على حبوب الجيل الثانى .

٣-تم اختيار السلالتين والجيل الأول والثانى فى المزرعة الرملية وكانت المعاملات : كونترول (محلول هوجلاند المغذى فقط) ومعاملة الجفاف (تعطيش ثم الرى كل ١٥ يوم بمحلول هوجلاند المغذى) وأخذت البيانات عند عمر ٧٠ يوم من الإنبات لصفات المحصول الآتية : طول النبات ، مساحة الورقة ، قطر الساق ، وزن المجموع الخضرى وعدد الأوراق .

٤-تم قياس تركيزات عناصر الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والماغنسيوم وكذلك نسبهم المختلفة فى نباتات الآباء والجيل الأول والثانى وتبين أن نسبة البوتاسيوم / الصوديوم قد انخفضت بشكل ملحوظ فى السلالة الحساسة تحت ظروف المعاملة مقارنة بالكنترول فى حين كان هذا الانخفاض طفيفا فى حالة السلالة المتحملة . أما فى حالة نسبة الكالسيوم / المغنسيوم فقد لوحظ ارتفاع هذه النسبة فى المعاملة عن الكونترول فى السلالة الحساسة فى حين سجلت هذه النسبة ثباتا نسبيا فى السلالة المتحملة تحت ظروف المعاملة مقارنة بالكونترول. أعطت نسبة الكالسيوم / البوتاسيوم ارتفاعا كبيرا فى السلالة الحساسة مقارنة بالكونترول فى حين أتسمت هذه النسبة بالثبات النسبى فى السلالة المتحملة تحت ظروف المعاملة مقارنة بالكنترول ، كذلك ارتفعت نسبة الكالسيوم / البوتاسيوم فى السلالة الحساسة ارتفاعا ملحوظا مقارنة بالسلالة المتحملة (ثلاثة أضعاف) . وكانت نسب هذه العناصر فى الجيل الأول أقرب للسلالة الحساسة منها الى السلالة المتحملة . وعند مقارنة طرز الجيل الثانى الأكثر تحملا للجفاف فى محتواها من العناصر السابقة مقارنة بنسبها فى السلالة المتحملة تحت ظروف المعاملة وجد أن تركيز الكالسيوم كان متساويا تقريبا ، فى حين سجلت تركيز الماغنسيوم انخفاضا طفيفا وسجل كل من البوتاسيوم والصوديوم انخفاضا حادا بالمقارنة بالسلالة المتحملة . أما طرز الجيل الثانى الأكثر حساسية للجفاف فعند مقارنة محتواها من هذه العناصر بما يقابلها فى السلالة المتحملة تحت ظروف الاجهاد المائى فقد تبين أن عناصر الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم قد سجلت انخفاضا طفيفا بينما كان الانخفاض شديدا فى حالة المغنسيوم . أما نسب كل من البوتاسيوم / الصوديوم والكالسيوم / الصوديوم والكالسيوم / البوتاسيوم والكالسيوم / المغنسيوم فى مجموعة نباتات الجيل الثانى الحساسة فقد كانت أقرب الى النسب المسجلة للسلالات المتحملة .

٥-أظهرت نتائج المزرعة الرملية ارتفاع محتوى السلالة المتحملة وكذلك السلالة الحساسة من البرولين تحت ظروف الجفاف مقارنة بالكونترول . بينما كانت هذه النسبة أقل في مجموعة نباتات الجيل الثاني المتحملة مقارنة بمثيلتها الحساسة .

٦-أظهرت نتائج التفريدالكهربي للبروتينات الذائبة في الماء ومشابهات الانزيمات ما يلي :

أ - بالنسبة للبروتينات فإن الأب المتحمل G621W أظهر ثلاث حزم ١٩،٢٩،٣٠ تحت المعاملة بينما لم تظهر تحت الكنترول ، كما أظهرت هذه السلالة كثافة لونية عالية في الحزم تحت كلا من ظروف الكنترول ومعاملة الجفاف ، كما أظهرت السلالة الحساسة G603W نفس العدد الكلي من الحزم مثل الأب المتحمل ولكن بكثافة لونية أقل وكانت نباتات الجيل الأول أقرب ما تكون الى الأب المتحمل وأظهرت عددا كبيرا من الحزم تحت كلا من الكنترول والمعاملة ، كما أن نباتات الجيل الأول المعاملة أظهرت بعض الحزم ٩،١٨،١٩ التي قد تكون مرتبطة بتحمل الجفاف .

ب- بالنسبة لمشابهات انزيم البيروكسيديز ، فقد أظهر الأب الحساس G603W الحزمتين ٤ و ٥ في الاتجاه الأنودي بينما لم تظهر هاتان الحزمتان في الأب المتحمل مما يوضح أن هاتين الحزمتين غير مرتبطتين بالتحمل بالجفاف . ولم تعط مشابهات انزيم البيروكسيديز حزم يمكن الاعتماد عليها في التفريق بين المجموعة المتحملة والمجموعة السادسة .

جـ-في مشابهات انزيم الاستيريز ، ظهرت الحزمة رقم ١ في الاتجاه الأنودي تحت ظروف الجفاف في كلا الأبوين ولكن بكثافة عالية في الأب الحساس بينما ظهرت الحزمة رقم ٢ في نفس الاتجاه في الأب الحساس فقط تحت ظروف كلا من الكنترول والمعاملة . بالنسبة لنباتات الجيل الثاني فقد ظهرت الحزمتين ٢ و ٣ في الاتجاه الأنودي تحت ظروف معاملة الجفاف في المجموعة المتحملة بينما في المجموعة الحساسة ظهرت الحزمة رقم ١ في الاتجاه الأنودي تحت ظروف الجفاف مقارنة بالكنترول .

د- بالنسبة لانزيم الفوسفاتيز الحامضي أظهر الأب المتحمل G621W كثافة أعلى في الحزمتين رقم ٣ و ٤ تحت ظروف الجفاف مقارنة بالكنترول بينما الحزمتين رقم ٥ و ٦ ظهرتا فقط في الأب الحساس G603W بنفس الكثافة تحت ظروف المعاملة والكنترول. في نباتات الجيل الثاني ظهرت الحزمة رقم ٢ فقط في المجموعة المتحملة والتي يمكن اعتبارها ككشاف كيماوي لتحمل الجفاف .

٧-تم اختبار مستخلص الـ DNA بطريقة تحليل ضم الانعزالات المتفارقة Bulked Segregant Analysis للطرز الوراثية للأباء والجيل الأول ومجموعة من نباتات الجيل الثانى المتمثلة للتراكيب الوراثية الأكثر تحملا للجفاف مقابل تلك الحساسة لهذة الصفة . وقد استخدمت ثلاث بادئات عشوائية (كل بادىء يتكون من ١٠ قواعد) وهى B02 , B07 , B11 وكان الحد الأقصى لعدد الحزم التى ظهرت لكل من هذه البادئات من خلال تفاعل الـ PCR ١٤ حزمة إلا أن ثلاثة منها أعطت تعدد الأشكال المظهرية (Polymorphism) لكل حزمة . حيث أعطى البادىء B02 حزمة ذات وزن جزيئى ١,٤ كيلو قاعدة فى السلالة المتحملة ونباتات الجيل الأول ومجموعة نباتات الجيل الثانى المتحملة فى حين اختفت تماما تلك الحزمة من السلالة الحساسة وكذلك مجموعة نباتات الجيل الثانى . كذلك ظهرت حزمة بوزن جزيئى ١,٨ كيلو قاعدة للبادىء B07 وأخرى بوزن جزيئى ٣,٥ كيلو قاعدة للبادىء B11 وكلاهما أقتصر ظهوره على الأب المتحمل والجيل الأول ومجموعة الجيل الثانى المتحملة للجفاف فقط بينما اختفت من الأب الحساس أو مجموعة الجيل الثانى الحساسة وتعد هذه الكشافات أول كشافات منشورة لتحمل الجفاف فى الذرة الشامية .

٨-أظهرت بادرات الجيل الثانى التى تم تشعيع حبوبها بجرعة إشعاعية ١٠ كيلو راد اختزالا فى بعض الصفات مثل طول النبات ومساحة الورقة وطول الجذور مقارنة بالبادرات الغير مشععة وذلك تحت ظروف المحلول المغذى فقط بدون معاملة جفاف . كما ظهر التأثير الواضح لكلا من الإشعاع ومعاملة الجفاف على نفس الصفات السابقة حيث اختزلت هذه الصفات بشدة مقارنة بتلك الغير مشععة تحت ظروف معاملة الجفاف .

٢- دراسات سيتولوجية وجزيئية لتأثير مبيدات الحشائش على العلاقات التكافلية بين الريزوبيوم وبعض أصناف الفول البلدى

للسيد / شريف أدريس محمد للحصول على درجة الماجستير فى العلوم الزراعية (وراثة) من كلية الزراعة جامعة عين شمس تحت إشراف أ٠د٠ السيد حسن حسانين ، أ٠د٠ فتوح محمد عبد المجيد الدمياطى ، د٠ وفاء عبد النبى محمد عبد النبى بقسم علوم الوراثة بالكلية عام ٢٠٠٠ .

يعتبر نبات الفول البلدى أحد أهم المحاصيل التى تزرع بمصر ويعتبر من المحاصيل التى تمثل نسبة عالية من الاستهلاك نظرا لاحتوائه على نسبة عالية من البروتينات . كما تعتبر مقاومة الحشائش باستخدام المبيدات أحد أهم العمليات الزراعية للحصول على محصول وافر منه . أيضا من المفيد والضرورى لهذا المحصول هو وجود بكتريا مثبتة للنيتروجين فى التربة التى يزرع بها كالريزوبيوم .

تهدف الدراسة الى تحديد مدى تأثير بعض مبيدات الحشائش والمستخدمة بصورة تجارية فى مكافحة حشائش الفول على العلاقة التكافلية بين نبات الفول وبكتريا الريزوبيوم . ومن أجل تحقيق هذا الهدف تم استخدام ثلاثة أصناف من الفول البلدى وهى (جيزة ٧١٤ وجيزة ٤٦١ وجيزة ٢) وكذا استخدام سلالة الريزوبيوم ٤٨١ والتى تستعمل كلقاح تجارى للفول البلدى وذلك فى وجود ثلاث مبيدات حشائش هى البازاجران والفيوزليد والراونداأب (جليفوست) بتركيزات مختلفة (التركيز الموصى به ونصفه وضعفه على الترتيب) . وتم استخدام عدة طرق للوصول الى هذا الهدف منها تحليل البروتينات الكلية بطريقة التفريد الكهربي لكلا من أصناف الفول الثلاثة المعاملة بالمبيدات الثلاثة فى وجود سلالة الريزوبيوم تحت الدراسة وأيضا قياس معدل النمو الميكروبى فى مزارع الريزوبيوم المعاملة بالمبيدات الثلاثة عن طريق قياس كثافة الضوء النافذ لهذه المزارع . كما تم عزل البلازميد المسئول عن عملية التكافل من السلالة المستخدمة من الريزوبيوم للتأكد من عدم تأثير المعاملة بالمبيدات الثلاثة عليه . وقد توصلت الدراسة للنتائج التالية :

١-أقوى تأثير علي الميكروب والنبات معا كان عند المعاملة بمبيد البازاجران وخاصة فى ضعف التركيز الموصى به للمبيد .

٢-استطاع الميكروب مقاومة وتكسير المبيد راونداأب (جليفوسيت) خاصة عند التركيز الموصى به وأيضا نصف الموصي به .

٣-عند تأثير البلازميد المحتوى على جميع المعلومات الوراثية الخاصة بالتكافل على مستوى الميكروب مما يعطى نتيجة تطبيقية هامة للبحث وهى أن استعمال مبيدات الحشائش (تحت الدراسة) لا يؤثر على كفاءة الميكروب فى تثبيت النتروجين على الرغم من التأثير على نسبة نمو الميكروب فى التركيزات المختلفة تحت الدراسة .

٤-كان تأثير المبيدات الثلاثة على عدد العقد الجذرية ونسبة الهيموجلوبين البقولى قد يرجع الى تأثير تلك المبيدات على النبات بصورة أعلى من تأثيرها على الميكروب .

٥-أظهر التحليل الوصفى للبروتينات الخاصة بالميكروب أو النباتات المعاملة بالمبيدات الثلاثة وجود تباينات عديدة للطراز الحزمى من حيث غياب أو ظهور حزم جديدة مختلفة فى الميكروب أو النباتات الغير معاملة .

٦-أظهرت النتائج عموما أن التأثير الأقوى لمبيدات الحشائش كان عاملا مؤثرا فى اتمام العملية التكافلية بالنسبة بعكس تأثر الميكروب بهذه المبيدات بمعنى آخر أن معاملة النباتات بهذه المبيدات قد تؤثر على الجينات المسئولة عن الإشارات الخلوية (من النبات) لتحفيز جينات تكوين العقد الجذرية (فى الميكروب) بينما التأثير على هذا الجينات لا يظهر بوضوح عند معاملة الميكروب بنفس هذه المبيدات .

٣- دراسات وراثية على بعض الجينات البكتيرية المقاومة للمعادن الثقيلة

للسيد / عمر تاج الدين محمود صائب للحصول على درجة الماجستير فى العلوم الزراعية (وراثة) من كلية الزراعة جامعة عين شمس عام ٢٠٠٠ تحت إشراف أ٠د٠ على زين العابدين عبد السلام ، أ٠د٠ سمير عبد العزيز ابراهيم ، أ٠د٠ محمد صفوت عبد السلام . أساتذة الوراثة بالكلية والمركز القومى للبحوث .

فى هذه الدراسة تم جمع ٢٤٩ عزلة تابعة لجنس سيدوموناس من مناطق جغرافية مختلفة داخل جمهورية مصر العربية تضمنت بحيرة المنزلة ومنطقة وسط الدلتا ومنطقة الجبل الأصفر ومصنع الحديد والصلب بحلوان ومحافظة الفيوم .

تم تعريف العزلات البكتيرية بطرق التعريف المختلفة المتعارف عليها . كذلك تم اختبارها لصفة المقاومة لعشرة معادن ثقيلة هى كلوريد الكادميوم وكلوريد الكوبلت وكلوريد النحاسيك وكلوريد الحديديك وكلوريد الزئبقيك وخلات الرصاص وكبريتات النيكل وثنائى كرومات البوتاسيوم ونترات الفضة وخلات الزنك بطريقة التخفيف بالأجار . كذلك تم إجراء النماذج البلازميدية لهذه العزلات .

لإجراء المزيد من التجارب تم اختبار عشرة سلالات تابعة للجنس سيدوموناس (ثمانية تابعة للنوع سيدومونا أريجينوزا وأثنان تابعان للنوع سيدوموناس فلوروسينس) واختبار مقاومتهم لخمسة مضادات حيوية شائعة الاستخدام وهى الكلور امفينيكول والكاناميسين والتتراسيكلين والأمبسيلين والأستربتوميسين وكذلك إخضاعهم لتجارب عزل البلازميدات والتخلص من البلازميدات وتجارب الاقتران البكتيرى المختلفة وتجارب اختبار الثبات الوراثى للصفات المنتقلة ، ويمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها فيما يلى :

١-أظهر كل من خلات الزنك وخلات الرصاص أعلى القيم في كل من (التركيزات الدنيا المثبطة وقيم المقاومة المحسوبة وأعلى تركيز مقاوم) وعلى الجانب الآخر حصل كل من كلوريد الزئبقيك ونترات الفضة على أقل مستوى للثلاثة قيم السابقة الذكر .

٢-كانت أعلى نسبة مئوية للمقاومة لكلوريد الحديديك (٩٦,٣٨%) وتلتها نسبة المقاومة ضد كبريتات النيكل (٨١,١٢%) ثم خلات الرصاص (٧٨,٣١%) ثم كبريتات الزنك (٧٦,٠٦%) ثم كلوريد النحاسيك (٦٣,٤٥%) ثم كلوريد الكادميوم (٤٠,١٥%) ثم كلوريد الزئبقيك (٢٣,٦٩%) وثنائي كرومات البوتاسيوم (١٧,٢٦%) وكلوريد الكوبلت (١٦,٤٦%) . بينما كانت أقل نسبة مقاومة (ضمن الـ ٢٤٩ سلالة المختبرة) لنترات الفضة (٢,٨١%).

٣-حصلت العزلات الخاصة بمنطقة وسط الدلتا على اعلى نسبة للمقاومة لمعظم المعادن الثقيلة المختبرة على الجانب الآخر حصلت عزلات منطقة الفيوم على أقل قيم لمعظم المعادن الثقيلة . في حين حصلت عزلات مصانع الحديد والصلب على أعلى نسب مقاومة لخلات الرصاص وعزلات بحيرة المنزلة على أعلى نسبة مقاومة لثنائي كرومات البوتاسيوم وعزلات الجبل الأصفر على أعلى نسبة مقاومة للكوبلت . ولم توجد أي عزلة مقاومة لنترات الفضة ضمن عزلات محافظة الفيوم ومصنع الحديد والصلب وبحيرة المنزلة .

٤-كشفت تجارب المقاومة المشتركة على وجود مستويات عالية للمقاومة المشتركة بين كل من كبريتات النيكل وكلوريد الحديديك وخلات الزنك مع باقي المعادن الثقيلة المدروسة . كذلك وجدت مستويات عالية للمقاومة المشتركة ما بين الكادميوم والزنك والكوبلت . وكذلك لوحظت مستويات منخفضة للمقاومة المشتركة لكل المعادن الثقيلة المدروسة – على حده – مع نترات الفضة . بينما أظهرت نترات الفضة على أعلى مستوى للمقاومة المشتركة مع كبريتات النيكل (١٠٠%) .

٥-وقعت طرز المقاومة للمعادن الثقيلة للـ ٢٤٩ عزلة المدروسة ضمن ٧٠ طرز مقاومة مختلف مما يعكس عدم تجانس المقاومة البكتيرية ضمن عزلات السيدوموناس المدروسة مما يدعم فكرة اختلاف ميكانيكيات المقاومة للمعادن الثقيلة المختلفة وبالتالي اختلاف الجينات المسئولة عن تلك الميكانيكات .

٦-أظهرت تجارب المقاومة المتعددة أن (٦,٤%) من السلالات كانت مقاومة لمعدن ثقيل واحد فقط في حين كانت (٩٣,٦%) مقاومة لأكثر من معدن ثقيل (٢-٩ معدن ثقيل) ، (٢%) من العزلات كانت مقاومة لتسعة معادن من العشرة معادن ثقيلة المدروسة .

٧-كانت العشرة سلالات المختارة متباينة ومتعددة المقاومة للمعادن الثقيلة وتراوحت مقاومة كل منها لسبعة الى تسعة معادن ثقيلة بينما كانت جميعها مقاومة لكل من النحاس والكادميوم والرصاص والنيكل والزنك والحديد في حين كانت خمسة سلالات منها مقاومة للفضة بينما كانت ثلاثة سلالات منها مقاومة للكوبلت وثلاثة منها مقاومة للكرومات .

٨-كانت تسعة سلالات من العشرة سلالات المختارة مقاومة لأربعة من الخمسة مضادات حيوية المختبرة . بينما كانت جميع السلالات العشرة مقاومة للكلورامفينيكول والكاناميسين وكانت هناك تسعة سلالات مقاومة للتتراسيكلين والأمبسيللين . وثلاثة سلالات فقط مقاومة للأستربتومايسين . من جهة اخرى أظهرت العشرة سلالات حساسية للريفاميسين وبينما كانت سبعة حساسة للأستربتومايسين وثلاثة منها حساسة للناليديكسيك آسيد .

٩-أوضحت نماذج البلازميدات الخاصة بالعزلات المدروسة أن كل منها يحتوى على بلازميد كبير واحد على الأقل في حين احتوت العشرة سلالات المختارة على بلازميدان صغيران (S2 , S1) ذوى أوزان جزيئية أكبر من ٢,٦ كيلو من أزواج القواعد بالإضافة الى احتواءها على عدد من البلازميدات الكبيرة تراوح ما بين ٢-٤-٥ بلازميدات كبيرة .

١٠-أثبتت تجارب التخلص من البلازميدات أن صفات المقاومة للكادميوم والكوبلت والنحاس والفضة ، والكرومات والزئبق والنيكل والزنك بلازميدية المنشأ بينما كانت صفة المقاومة للرصاص والحديد كروموسومية المنشأ كذلك اتضح منها ان جين أو جينات المقاومة للكرومات متواجد على البلازميد الكبير (L4) وأن الجينات المسئولة عن المقاومة للمضادات الحيوية بلازميدية المنشأ أيضا .

١١-أوضحت تجارب التخلص من البلازميدات أن طريقة الأقراص الورقية المشبعة بعوامل التخلص من البلازميدات كانت أفضل وأكثر كفاءة في التخلص من البلازميدات عن طريق إضافة عوامل التخلص من البلازميدات للبيئات السائلة وكان الإيثيديم بروميد أفضل عوامل إزالة البلازميدات بينما كان الأكريفلافين أقلها كفاءة في كلتا الطريقتين المستخدمتين .

١٢-أكدت تجارب الاقتران البكتيرى نتائج تجارب التخلص من البلازميد حيث استعادت العزلات الفاقدة للبلازميدات صفات المقاومة للكادميوم والكوبلت والنحاس والفضة والكرومات والزئبق والنيكل والزنك المفقودة مع إستعادة البلازميدات .

كذلك ساهمت هذه التجارب فى تحديد وجود الجين أو الجينات الخاصة بالمقاومة للنيكل على البلازميد الصغير (S1) وأوضحت تواجد جين أو جينات المقاومة للنحاس على البلازميد الصغير (S2) .

تم إجراء الاقترانات البكتيرية بين العشرة سلالات المختارة وبين سلالة سيدوموناس فلورسينس لدراسة الانتقال الجينى البلازميدى الداخل جنسي . تراوحت معدلات الانتقال ما بين ١,٥٥ × ١٠^-٨ الى ٢,٩٧ × ١٠^-٧ بمتوسط ١,٢٣ × ١٠^-٧ .

ولدراسة الانتقال الجينى البلازميدى ما بين الأجناس المختلفة تم إجراء الاقتران البكتيرى بين السلالات العشرة المختارة وسلالتى الايشيرشياكولاى (DH5a ، RRI) وسلالة تابعة للنوع البكتيرى ريزوبيم .

معدل الانتقال للأيشيرشياكولاى تراوح ما بين ١,٠٦ × ١٠^-٧ الى ٤ × ١٠^-٧ بمتوسط ١,٧٤ × ١٠^-٨ . ولم تسفر محاولات الاقتران البكتيرى مع الريزوبيم عن اى نجاح.

أوضحت نتائج الدراسة عن انتشار المقاومة البكتيرية للمعادن الثقيلة فى المناطق المختلفة فى جمهورية مصر العربية وربما يرجع ذلك الى السلوك الإنسانى السيىء والمؤدى الى تراكم المعادن الثقيلة السامة فى البيئة مما أدى لإنتخاب كائنات دقيقة مقاومة لتلك المعادن الثقيلة .

وقد أظهرت الدراسة أيضا انتشار صفات المقاومة للعديد من المعادن الثقيلة والمضادات الحيوية فى انواع السيدوموناس المختلفة والتي قد تصيب العديد من الكائنات الحية مما قد يؤدى لإنتخاب سلالات لا يمكن مقاومتها والتى قد تسبب أضرار بالغة للإنسان والحيوان وحتى النباتات .

وهكذا فإنه ينصح بمنع أو على الأقل الاقلال من دخول المعادن الثقيلة لبيئتنا عن طريق القيام بمعالجة المخلفات والاستعمال الرشيد للمواد المحتوية على المعادن الثقيلة .

كذلك من الممكن استخدام الكائنات الدقيقة او اى من الكائنات الحية التى يمكنها تجميع وتراكم المعادن السامة بداخلها وذلك لخفض مستويات التلوث بالمعادن الثقيلة فى المناطق الملوثة فى بيئتنا المصرية .

٤- البصمة الوراثية البيوكيميائية لبعض أصناف القمح

للسيد / جمال هاشم محمد سالم الشعبى للحصول على درجة الماجستير فى العلوم الزراعية (وراثة) من كلية الزراعة جامعة عين شمس ١٩٩٨ تحت إشراف أ٠د٠ محمد عبد السلام راشد ، د٠ فتوح محمد الدمياطى ، د٠ خالد ابن الوليد فهمى .

تمت هذه الدراسة فى معامل قسم الوراثة بكلية الزراعة بجامعة عين شمس – شبرا الخيمة – القاهرة – جمهورية مصر العربية خلال الفترة من ١٩٩٥ – ١٩٩٨ .

تهدف هذه الدراسة الى إيجاد بعض المعلامات البيوكيميائية والجزيئية لعمل بصمة وراثية لبعض أصناف القمح باستخدام تقنيات التفريد الكهربائى للبروتين والمشابهات الانزيمية بالإضافة الى تقنية التكبير العشوائى متعدد الصور للحمض النووى الديزوكسى ريبوز RAPD-PCR .

تم تجميع عشرين صنف من أصناف القمح والتى استخدمت فى هذه الدراسة من كل من جمهورية مصر العربية والجمهورية اليمنية بحيث تمثل هذه الأصناف الأقماح الثنائية والرباعية والسداسية ويمكن تلخيص أهم النتائج عليها فيما يلى :

أولا : التفريد الكهربائى للبروتين Protein Electrophoresis (SDS-PAGE)

١- البروتين الذائب فى الماء Water Soluble Protein : أظهرت تقنية (SDS-PAGE) ٤٥ حزمة مختلفة فى الوزن الجزيئى وبالنظر الى هذه الحزم وجد أن الأحد عشر صنفا من الأقماح الرباعية تميزت بوجود حزمة واخدة مميزة للأصناف السداسية تم تبويب الأصناف العشرين وتم تبويب الأصناف العشرين المختبرة طبقا لبعض الحزم الفريدة والتى ظهرت بصفة استثنائية فى معظم الأصناف .

٢- البروتين الغير ذائب فى الماء Water non-Soluble Protein : أظهرت تقنية (SDS-PAGE) وجود ٤٣ حزمة مميزة والتى لم يعبر عنه دائما فى كل الأصناف وتوزعت هذه الحزم الى ثلاث مناطق للجلوتين أ ، ب ، جـ .
تميزت الأقماح الرباعية بوجود ثلاث حزم شائعة بينما أظهرت الأقماح الثنائية والسداسية وجود خمسة حزم شائعة لكل منها وتم تعريف العشرين صنف أيضا لظهور الحزم الفريدة لكل منها .

٣- البروتينات الذائبة فى الكحول Alcohol Soluble Protein يتركب الجليادين من أربعة تحت أقسام $\alpha , \beta , \gamma , \omega$ وأظهرت نتائج (SDS-PAGE) عن وجود ٤٦ حزمة والتى ليس من الضرورى وجودها فى جميع الأصناف .

عبرت الأصناف الرباعية عن أربعة حزم شائعة ويمكن التفريق بينها وبين كل من الأصناف الثنائية والسداسية باستخدام الحزمة ٠,٥٣ هذا بالإضافة الى أن الأصناف الرباعية فشلت فى التعبير عن أى حزمة فى منطقة أوميجا (ω) .

بالنظر الى كل النتائج المتحصل عليها من أنماط التفريد الكهربى للبروتينات الذائبة فى الماء والبروتينات الغير ذائبة فى الماء والجليادين فإنها كانت فعالة لتعريف العشرين صنف من القمح تحت الدراسة والتى أمكن تقسيمها الى ١٦ ، ١٨ ، ٨ أقسام طبقا لأنماط التفريد الكهربى .

بغض النظر عن الأصناف الرباعية فإن التفريد الكهربى للنظم الثلاثة أبدى نفس النجاح فى عمل البصمة الوراثية للعشرين صنف من القمح تحت الدراسة .

ثانيا : التفريد الكهربى للمشابهات الإنزيمية Isozyme electrophoresis :

أظهر التفريد الكهربى لسبعة نظم من المشابهات الإنزيمية فى العشرين صنف من الأقماح المستخدمة فى الدراسة باستخدام Native – PAGE وجود أربعة مجموعات للأستريز وخمسة لإنزيم البيروكسديز وثلاثة للأميليز والجلوتامات أوكسالو ترانس امينيز وستة للفوسفاتيز الحامضى وأربعة للكحول ديهيدروجينز وخمسة المالايت ديهيدروجينز وكانت هذه النظم من المشابهات الإنزيمية كافية تماما لتعريف العشرين صنف من القمح .

ثالثا : التكبير العشوائى للصور المتعددة للحمض النووى الديزوكسى ريبوز باستخدام PCR

استخدمت تقنية PAPD-PCR لإيجاد بعض العلامات المميزة لعمل البصمة الوراثية للعشرين صنف من القمح ولهذا الغرض تم استخدام إحدى عشر من البادئات العشوائية هى : OPB-01 , 02,05,06,07,08,10,11,12,14,16 بالإضافة الى البادىء الخاص بالجلوتينين ذو الوزن الجزيئى المنخفض (LMWG-20 bp) .

أظهرت النتائج المتحصل عليها تعريف كامل لهذه الأصناف وكانت بعض هذه البادئات أكثر نجاحا فى تعريف الأصناف مثل البادىء OPB-05 , OPB-14 حيث أنتجا أكبر عدد من العلامات المميزة RAPD .

٥- الأدلة الوراثية البيوكيميائية للمقاومة للحشرات فى الأنواع الرئيسية من الجنس سبموبوجون

للسيد / محمد مصطفى إبراهيم للحصول على درجة الماجستير فى العلوم الزراعية من كلية الزراعة جامعة عين شمس عام ٢٠٠٠ تحت إشراف أ.د. سمير عبد العزيز ابراهيم أستاذ الوراثة بالكلية .

يعتبر الجنس سمبوبوجون من الأجناس المحتوية على أنواع عديدة بها زيوت طيارة ويقع تحت العائلة النجيلية وفى مصر استوردت حديثا حشيشة الليمون وحشيشة السترونيلا وهما نوعان من هذا الجنس وقد أشارت العديد من الدراسات الى اهمية المواد المستخلصة من حشيشة الليمون وحشيشة السترونيلا فى مناطق المنشأ (الاستوائية وشبة الاستوائية) ضد الآفات المختلفة فى تثبيط نمو أطوار الحشرات وتقليل الخصوبة وزيادة نسبة الموت وكذلك فعالية المجموع الخضرى عند زراعتها زراعة مشتركة مع الكركدية الغامق من مصادر جنوب الصعيد وقد أجرى البحث الحالى بمزرعة القناطر الخيرية التابعة للمركز القومى للبحوث لدراسة الأدلة الوراثية البيوكيماوية المقاومة للحشرات (ديدان اللوز) فى بعض الأنواع الرئيسية للجنس سمبوبوجون (حشيشة الليمون وحشيشة السترونيلا) في دراسة حقلية وللحصول على الطرز الوراثية اللازمة لهذه الدراسة تم زراعة ٢٧ سلالة خضرية من كلا النوعين (حشيشة الليمون والسترونيلا) فى عشيرة أساسية مع أربعة مصادر من الكركدية الغامق من مصادر جنوب الصعيد وذلك فى عام ١٩٩٦ وأخذت البيانات اللازمة الخاصة بالإصابة فى مصادر الكركدية المقابلة لسلالة حشيشة الليمون والسترونيلا . تم إجراء الانتخاب على أساس نسبة الإصابة فى الكركدية وتم إنتخاب ١٠ سلالات من كلا النوعين (حشيشة الليمون والسترونيلا) خلال عامين متتاليين ٩٧ ، ٩٨ وتم أخذ البيانات اللازمة ثم تم تقييم للسلالات المنتخبة من حيث تأثيرها على ديدان اللوز القرنفلية تقييما حقليا ومعمليا وكيميائيا للمكونات الموجودة فى الزيوت الطيارة بواسطة جهاز GC/MS لدراسة العلاقة بين الإصابة ووجود مركبات معينة فعالة ضد الآفات من رتبة حرشفية الأجنحة .

استهدفت هذه الدراسة ما يلى :

أولا : دراسة الانتخاب فى العشيرة الأساسية على أساس الإصابة فى الكركدية بدراسة ٥ صفات فى مصادر الكركدية الأربعة وهى على الترتيب : عدد الأفرع فى الكركدية – عدد الثمار السليمة على الفرع الوسطى – عدد الثمار المصابة على الفرع الوسطى . عدد الثمار السليمة على الفرع الطرفى – عدد الثمار المصابة على الفرع الطرفى . وكذلك دراسة نسبة الحيوية فى سلالات حشيشة الليمون والسترونيلا المقابلة للكركدية .

ثانيا : دراسة السلالات المنتخبة والمصادر المنتخبة ودراسة كمية للمحصول حيث تم دراسة ٧ صفات كمية فى السلالات الخضرية للجنس سمبوبوجون وهى على الترتيب :

١-طول النبات .
٢-عدد الخلفات .
٣-الوزن الطازج .
٤-الوزن الجاف .
٥-عرض الورقة .
٦-محصول الزيت الطيار .
٧-عرض الورقة .

ودراسة الصفات الخاصة بالإصابة فى مصادر الكركدية المقابلة لها وهى على الترتيب ٨ صفات مدروسة :

١-عدد الأفرع .
٢-عدد اللوز السليم على الفرع الطرفى .
٣-عدد اللوز المصاب على الفرع الطرفى .
٤-عدد اللوز المصاب على الفرع الوسطى .
٥-عدد اللوز السليم على الفرع الوسطى .
٦-نسبة الإصابة على الفرعين الطرفين والوسطى .
٧-نسبة الإصابة على النبات .
٨-عدد اللوز الكلى على النبات .

ثالثا : دراسة التباين فى المكونات الكيميائية (الزيوت الطيارة – التربينات) للسلالات المنتخبة من حشيشة الليمون والسترونيلا (أعلى ٤ سلالات فى نسبة الزيت وأقل نسبة إصابة) من خلال التحليل الدقيق للزيوت الطيارة ودراسة مكوناتها باستخدام جهاز GC/MS ودراسة الاختلافات فى مكونات الزيت وصفيا وكميا .

رابعا : التأثير المضاد للحشرات (ديدان اللوز – دودة اللوز القرنفلية) من خلال عمل ستة تركيزات (مختلفة معمليا) بالإضافة الى تجربة المقارنة ودراسة الجرعة المميتة لنصف الأفراد والزمن المميت لنصف الأفراد وكذلك LC_{30} , LC_{90} بالإضافة الى LT_{90} , LT_{30} .

كانت أهم النتائج المتحصل عليها ما يلى :

- أظهرت تحليل التباين بين الخمس صفات المدروسة فى المصادر المنزرعة مع بعض سلالات حشيشة الليمون والسترونيلا فى موسم العشيرة الأساسية وجود فروق معنوية بين الصفات المدروسة وهى على الترتيب : عدد الأفرع – عدد اللوز السليم على الفرع الطرفى – عدد اللوز السليم على الفرع الوسطى – عدد اللوز المصاب على الفرع الطرفى – عدد اللوز المصاب على الفرع الوسطى .
- بلغ المتوسط العام لصفات الإصابة على الفرع الوسطى ١,٣٧ ± ٠,١٢ مع معامل اختلاف قدرة ٥٦,٣٣% بينما فى صفة الإصابة على الفرع الطرفى كان المتوسط العام للإصابة ٣,٠٧ ± ٠,٢١ مع معامل اختلاف قدره ٤٣,٢١% .
- تراوحت قيم المكافىء الوراثى للصفات المدروسة بين ٠,١٢٢ الى ٠,٤٥٨ فى صفات عدد الثمار المصابة على الفرع الوسطى وعدد الأفرع ويلاحظ انخفاض قيم المكافىء الوراثى لصفات الإصابة فى العشيرة الأساسية نتيجة تأثرها الشديد بالبيئة وجدوى الانتخاب ضدها .
- درست السلالات من نوعى السترونيلا وخشيشة الليمون فى الزراعة المشتركة مع بعض مصادر الكركدية لصفة الحيوية وأظهرت وجود اختلاف بين السلالات المدروسة حيث كان أعلى قيمة ١٠٠% فى السلالة رقم ٤٠/٧ مقابل ١٤,٣% فى السلالة رقم ٢٧/٢ وكانت الفروق بين السلالات المدروسة معنوية لهذه الصفة .
- دلت قيمة المكافىء الوراثى لنسبة الحيوية على انخفاض قيمتها حوالى ٠,٤٨٤ وهذا يدل على تأثرها الشديد بالبيئة والانتخاب الطبيعى وكان المتوسط العام لهذه الصفة ٦٣,١٢ ± ٣,٧٠ وكان متوسط أعلى قيمة فى السلالة رقم (٤٠/٧) هى ٧٦,٦٢ ± ٥,٦٢ مع معامل اختلاف قدره ١٧,٩٧ بينما كانت أقل قيمة للسلالة رقم ٢٢/١ هى ٤٦,٤ ± ٩,٤٣ مع معامل اختلاف قدره ٤٨,٧٦ .
- أظهرت تحليل التباين بين ٨ صفات المدروسة فى الكركدية وجود فروق معنوية بين صفات الإصابة فى المعاملات ولكن لم تكن المصادر معنوية . وكانت الفروق بين السنين معنوية فى الموسمين الأول والثانى فى أغلب الصفات المدروسة وكان التفاعل بين المعاملات والسنين معنويا فيما عدا بعض الصفات مثل عدد اللوز المصاب على الفرع الطرفى وكان التفاعل بين المصادر والسنوات غير معنوى فى أغلب الصفات المدروسة .

- أظهرت تحليل التباين لصفات المحصول وصفات الزيت مثل نسبة الزيت ومحصول الزيت فروقا معنوية فى الموسمين تحت الدراسة فى السلالات المختلفة من حشيشة الليمون والسترونيلا تحت ظروف الزراعة المشتركة مع الكركدية . حيث كانت الفروق بين الموسمين معنوية وكذلك بين السلالات الخضرية وكانت الفروق بين التفاعل فى الموسمين فروق معنوية فى بعض الصفات مثل الوزن الجاف وعدد الخلفات ولكن كانت التفاعل بين الصفات الأخرى غير معنوى .
- أظهرت صفات الزيت مثل نسبة الزيت ومحصول الزيت فروقا معنوية فى الموسم الأول فقط دون الموسم الثانى فى حشيشة الليمون فقط بينما كانت الفروق معنوية فى حالة السترونيلا فى الموسمين على التوالى لنفس الصفات .
- تراوحت قيم المكافىء الوراثى بمعناه الواسع فى الموسم الأول لصفات الإصابة والصفات المدروسة فى الكركدية المحمل على نوعى الجنس سمبوبوجون (حشيشة الليمون والسترونلا) بين ٠,٦٤٩٦ الى ٠,٢٥٣٨ حيث بلغت أعلى قيمة لها فى صفة عدد اللوز الكلى على النبات مقابل انخفاضها فى صفات عدد اللوز المصاب على الفرع الطرفى ونسبة الإصابة على الفرعين الطرفى والوسطى ٠,٢٥٣٨ ، ٠,٣٢٨١ على الترتيب .
- فى الموسم الثانى بلغت أعلى قيمة للمكافىء الوراثى ٠,٨١٠ فى صفات عدد اللوز الكلى على النبات أيضا تليها صفات نسبة الإصابة على الطرفى والوسطى ، عدد اللوز السليم على الفرع الطرفى حيث كانت ٠,٧٢ ، ٠,٦٣ على التوالي .
- يلاحظ تساوى قيم المكافىء الوراثى فى الموسمين الأول والثانى فى صفات عدد اللوز السليم على الفرع الطرفى (٠,٦٤٠٠ ، ٠,٦٣٦) وفى صفات عدد اللوز المصاب على الفرع الطرفى أيضا (٠,٢٦٢٠ ، ٠,٢٥٣٨) .
- تراوحت قيم المكافئ الوراثي من ٠,٨٢٢ الى ٠,٢١٥ فى صفات نسبة الزيت وطول النبات فى حشيشة الليمون فى الموسم الأول وفى الموسم الثانى تراوحت من ٠,٨٨٩ الى ٠,٣٩١ فى صفات عدد الخلفات ومحصول الزيت فى حشيشة الليمون أيضا بينما فى السترونيلا كانت قيم المكافىء الوراثى تتراوح بين ٠,٩٠٧ الى ٠,٥٢٤ فى صفات الوزن الجاف وعرض الورقة و ٠,٩٤٣ الى ٠,٦٧٨ فى صفات الوزن الجاف ونسبة الوزن الجاف ونسبة الزيت فى الموسمين الأول والثاني على التوالي .

- تراوحت قيم متوسطات صفات الإصابة فى الكركدية تحت ظـروف الزراعـة المشتركة مع سلالات حشيشة الليمون والسترونلا فى الموسم الأول بيـن ٠,٩٣ – ١,٦٧ فى سلالات حشيشة الليمون بينما بلغت ٠,٨٧ – ١,٩٣ فى سـلالات السترونيلا مقابل ٢,٩٥ فى الكنترول مع معامل اختلاف قـدره ٣١,٠% فـى الكنترول أيضا .

- يلاحظ انخفاض متوسطات الإصابة فى المعاملات عن الكنترول وخاصة فـى صفات عدد اللوز المصاب على الفرع الطرفى الذى أظهر انخفاضا عن صفـة عدد اللوز المصاب على الفرع الوسطى بالمقارنة بالكنترول حيث تراوحت بين (١,٤٠ – ٣,٧٠) مقابل ٥,٣٣ فى الكنترول فى الموسم الأول أيضا .

- تراوحت قيم متوسطات نسبة الإصابة ما بين ٧,٨٧% فى السلالة رقم (٥) مـن نوع حشيشة الليمون و ١٠,٢٠% فى السلالة رقم (٥) أيضا فـى السـترونيلا بالمقارنة بالكنترول الذى بلغ حوالى ٢٠% ويلاحظ انخفاض نسبة الإصابة الـى النصف تقريبا فى الكركدية تحت ظروف الزراعة المشتركة مع نوع حشيشـة الليمون والسترونيلا نتيجة التأثير المتداخل بينهما المضاد للحشرات .

- بمقارنة المتوسطات فى الموسم الأول والثانى لصفات عـدد الخلفـات ونسـبة الزيت ومحصول الزيت وعرض الورقة فـى نوعـى الجنـس سـمبوبوجون (حشيشة الليمون السترونيلا) يلاحظ زيادة المتوسط العام فى الموسـم الثـانى لصفة عدد الخلفات نتيجة تأثير النمو والتكاثر وتقاربت قيم متوسـطات نسـبة الزيت فى الموسم الأول والموسم الثانى حيث كـانت ١,٤٧ ± ٠,٢٣ (الأول) ، ٠,٦٧ ± ٠,٣٤ (الثانى) ، ٠,٧١ ± ٠,٠٣ (الثانى) بينمـا زادت متوسـطات محصول الزيت فى الموسم الثانى عن الموسم الأول حيث تراوحت القيمة مـا بين ١٣,٣٠ ± ٤,١ (الثانى) ، ٢,٢٣ ± ٠,٤٥ (الثانى) مقـابل ٢,٥٦ ± ٠,٦٨ (الأول) ٠,٣٣ ± ٠,٠١ (الأول) على الترتيب .

- درست الاختلافات الوصفية والكمية للزيوت الطيارة فى السـلالات المنتخبـة بطريقة تحليل GC/MS وحسب نسبة الزيت ومحصول الزيت حيـث كـانت السلالة رقم (٥) فى حشيشة الليمون أعلى قيمة فى نسبة الزيت ١,٤٧% فـى الموسم الأول والسلالة (٥) فى السترونيلا أعلى قيمة فى نسبة الزيـت ٠,٦٧% فى الموسم الأول أيضا .

ومن التحليل الوصفي والكمى للزيوت الطيار : أظهر التحليل الدقيق لمكونات الزيت تعريف ٢٣ مركب ووجود اختلافات فى نسب ومكونات المركبات المعرفة ووجود وغياب بعض المركبات فى سلالة عن السلالات الأخرى وهذا يعكس وجود اختلافات وراثية حيث تحكم إنتاج المركبات تفاعلات انزيمية محكومة بعوامل وراثية وكانت أهم المركبات ذات النسب الكبيرة هي جيرنيال ، نيرال ، سترال ، ميرسين ، لينالول ، أو سمين حيث تراوحت نسبها من ٥١,٧٦ ، ٣٧,٩٧ ، ٤٧,٩٨ ، ٨,٤٨ ، ٠,٩٨ ، ٠,٤٨ على التوالى وتم تعريف المكونات الصغيرة مثل سترونلال وكاريوفللين ، خلات جيرانيل التى تعتبر من المكونات الهامة فى التأثير على الحشرات وفى دورة التخليق الحيوى للناتج النهائى وهو الزيت الطيار .

تراوحت نسب المركبين الأساسيين وهما جيرانيال ، نيرال بين ٥١,٧٦% ، ١٨,٩٨% فى السلالة رقم ١٥/٣ ، ٢٦،٧ بمتوسط عام قدره ٢٩,٧٩ ومعامل اختلاف قدره ٨٢,٩٩% للمركب الأول ويتضح أهمية الاختلافات بين السلالات المدروسة فى نسب ومكونات الزيت الطيار مما يجعل لهذه السلالات قيمة طبية وعطرية تعكس مدى التباين فى الاختلافات الوصفية بين المركبات والتباين فى الخلفية الوراثية بينما فى الموسم الثانى كانت أعلى سلالة فى نسبة الزيت (١,٩٠) فى حشيشة الليمون فى السلالة رقم (٣) (١,٤٦) مقابل (١,٠٥) للسلالة رقم (٤) فى حشيشة السترونيلا .

- درس التأثير المضاد للحشرات للزيت الطيار فى المعمل على ديدان اللوز القرنفلية من خلال عمل ستة تركيزات مختلفة من الزيت للأربعة سلالات متميزة من النوعين (حشيشة الليمون والسترونيلا) وأبدت السلالات المختلفة تأثيرات فعالة على الفقس الحديث لدودة اللوز القرنفلية .
- تم إجراء اختيارات السمية لأربعة سلالات المنتخبة وهى أرقام ٢/٢٧ ، ١٠/٣ ، ٢٦/٧ ٦٠/٥ وذلك بمعاملة سطح الغذاء الصناعى فى أنابيب اختيار بتركيزات مختلفة هى : ٠,٢٥ ، ٠,٥ ، ١ ، ٢ ، ٤ الكنترول وأظهرت النتائج ان هذه الزيوت كان لها تأثير مباشر على موت اليرقات الحديثة الفقس لدودة اللوز القرنفلية وكان زيت السلالة رقم (١) (حشيشة الليمون) أعلى تأثير فى التركيزات ٤% وبينما كانت السلالة رقم (١) سترونيلا أقل تأثيرا على اليرقات تحت الدراسة .
- تم تحديد قيمة التركيز القاتل لنصف الأفراد وأمكن استنتاج ان جميع الزيوت المختبرة أظهرت تأثيرا ضد يرقات دودة اللوز القرنفلية .

- يلاحظ أنه بزيادة التركيز تزداد نسبة الموت في اليرقات حديثة الفقس لدودة اللوز القرنفلية وفي التركيز الأول كانت أعلى قيمة لنسبة الموت ١٥،٥٥ في السلالة رقم (١) سترونيلا بينما كانت في التركيز الثاني ٢٩,٤٤ السلالة رقم (١) حشيشة الليمون وفي التركيز الثالث والرابع تقاربت قيم نسب الموت بين سلالات حشيشة الليمون والسترونيلا .

- لوحظ اختلاف نسب الموت في التركيز الخامس (٤%) حيث كانت أعلى قيمة ٩١,٦٦ ، ٧٦,٧٠ في السلالات حشيشة الليمون (١) ، السترونيلا (٢) على التوالي .

- يتضح من هذه الدراسة بصفة عامة دور المركبات الثانوية التي ينتجها النبات في خفض نسبة الإصابة الحقلية وانتخاب سلالات تتميز بإنتاج مواد فعالة ضد اليرقات حديثة الفقس لدودة اللوز القرنفلية في الزراعة المشتركة مع النباتات المصابة من الكركدية ودروها في خفض الإصابة والتقليل من الحشائش التي تسببها للمحصول والمحافظة على البيئة وعلى المواد الفعال الطبية والعطرية كما تتبع هذه السلالات المتميزة قدرا من التباين الوراثي في إنتاج الزيوت الطيارة مما يعد ذخيرة جيدة للمصادر الوراثية والمحافظة غليها واستخدامها كنواة طيبة في برامج التربية بالطرق الحديثة على مستوى البيولوجيا الجزيئية كما تتميز هذه السلالات بأنها ذات قدرة على المواءمة عل النمو وإعطاء نمو خضري جيد وإنتاج مواد فعالة مضادة للحشرات .

٦- البصمة الوراثية لبعض سلالات أسماك البلطي

للسيد / ياسر محمد سعد محمد للحصول على درجة الماجستير في العلوم الزراعية (وراثة) من كلية الزراعة جامعة عين شمس تحت إشراف أ.د. محمد عبد السلام راشد ، د. أمين عبد المعطي الجمل ، د. طارق محمد عبد القادر طنطاوي بقسم الوراثة بالكلية .

أجريت هذه الدراسة بمعامل قسم الوراثة – جامعة عين شمس في الفترة ما بين ١٩٩٧ – ١٩٩٩. تهدف هذه الدراسة الى تحديد درجات التشابه والاختلاف بين وداخل ثلاثة سلالات من البلطي النيلي تم تجميعها من ثلاثة مناطق متباعدة نسبيا من جمهورية مصر العربية . وهي السلالة فوكي (مزرعة فوكي بالقليوبية) ، والسلالة سوهاج (مفرخ سوهاج) ، والسلالة منزلة (بحيرة المنزلة) . اهتمت هذه الدراسة بدراسة التنوع الوراثي بين وداخل هذه السلالات لتقييم مدى تجانسها ونقاوتها الوراثية . ولتحقيق أهداف البحث تم استخدام بعض طرق التفريد الكهربي لفصل البروتينات المستخلصة من العضلات الهيكلية

بالإضافة الى المشابهات الانزيمية لخمسة نظم انزيمية (الاستيريز والأسيد فوسفاتيز واللاكتات ديهيدروجينيز والمالايت ديهيدروجينيز والسوبر أكسيد ديسميوتيز) فى عشرة أعضاء من جسم السمكة (الكبد والمخ والطحال والعين والعضلات الحمراء والعضلات البيضاء والغدد الجنسية والخياشيم والقلب والكلية) ، هذا بالإضافة الى دراسة أفضل مواد التفاعل بالنسبة لانزيم الاستيرين بالإضافة لما سبق فقد تم توظيف تقنية مضاعفة تتابعات الحمض النووى DNA باستخدام ثلاثة عشرة من البادئات العشوائية باستخدام تقنية (PAPD_PCR) .

أهم النتائج المتحصل عليها

أولا : دراسة المشابهات الانزيمية

بدراسة اختلاف وتماثل التعبير الجينى فى عشرة أعضاء من جسم السمكة داخل كل سلالة ومقارنة كل عضو فيما بين السلالات المختلفة فقد أوضحت الدراسة أن :

١-بالنسبة لأنزيم الاسيدفوسفاتيز أظهر وجود خمسة حزم بين السلالات الثلاثة المستخدمة .

٢-بالنسبة لأنزيم اللاكتات ديهيدروجينيز تم تحديد أربعة حزم حيث أظهرت العين نموذج حزمى مختلف عن باقى الأعضاء بظهور حزمة فى منطقة الفصل الموجب تميز الخط فوكى عن سوهاج ومنزلة .

٣-بالنسبة لأنزيم والسوبر أكسيد ديسميوتيز فقد تم تحديد ثمانى حزم منهما حزمتين أظهرا هجرة رجعية وقد أبدت العضلات البيضاء أوضح نموذج حزمى باستخدام هذا الأنزيم .

٤-تم تحديد حزمتين فقط فى معظم الأعضاء فى حالة المالايت ديهيدروجينيز ولا يمكن الاعتماد عليه في التفريق بين أو داخل السلالات .

٥-أوضحت الدراسة أن أفضل الانزيمات التى يمكن الاعتماد عليها لدراسة التنوع الوراثى فيما بين السلالات وكذا التجانس الوراثى داخل هذه السلالات هو انزيم الاستيريز .

٦-باستخدام ثلاثة من مواد التفاعل المختلفة والتى يعمل عليها أنزيم الاستيريز وهى (ألفا-نافثيل بربيونات ، ألفا – نافثيل بيوتيرات وألفا- نافثيل فاليرات أظهر انزيم الاستيريز أفضل صورة التفاعل باستخدام ألفا – نافثيل بربيونات فى كل الأعضاء المدروسة) .

ثانيا : دراسة بروتينات العضلات الذائبة

تم تمثيل كل سلالة بعدد من الأفراد ما بين ١٢-١٤ سمكة تمثل مصـــدرا مختلفـا للعضلات ومقارنة طرز الحزم الناتجة ومقارنتها بطراز ضابط لقياس الأوزان الجزيئية لكل حزم البروتين الناتجة . أوضحت الدراسة أن :

١-كل سلالة قد تميزت بطرز محدد من حزم البروتين .

٢-متوسط معامل التشابه داخل السلالة سوهاج كان (٠,٣٦) .

٣-متوسط معامل التشابه داخل كل من السلالة فوكى والسلالة منزلة كان (٠,٤٧).

٤-متوسط معامل التشابه بين السلالة سوهاج وكل من السلالة فوكـــى والســلالة منزلة كان (٠,٤٧) .

٥-متوسط معامل التشابه بين السلالة فوكى والسلالة منزلة كان (٠,٤٩) .

مما سبق يتضح إمكان الاعتماد على البصمة الوراثية للبروتينات خاصـــة بروتيـن العضلات كما سبق للتفريق بين السلالات المختلفة بالإضافة الى دراسة التركيب الوراثـــى للعشائر المختلفة .

ثالثا : دراسة الاختلافات على المستوى الجزيئى

أظهرت الدراسة أن ستة بادئات فقط من الثلاثة عشر بادئا المستخدمة نجحت فـــى مضاعفة تتابعات الـــ DNA . وأظهرت الدراسة على المستوى الجزيئى باستخدام تقنيـــة RAPD-PCR أن هناك اختلافا فيما بين وداخل السلالات المستخدمة حيث أظهرت بعـض البادئات طرازا من الحزم مميزا لكل سلالات بالإضافة الى نجـــاح البعـض فـى كشـف الاختلافات الوراثية داخل كل سلالة على حدة ، هذا فضلا عن وجود طرز متمـــاثل فـــى جميع السلالات المستخدمة باستخدام البادىء OP-B14 .

اعتمادا على النتائج السابقة أمكن تكوين صورة محددة للتنوع الوراثى المميز لكـــل سلالة وداخل كل منها على حدة وبمقارنة النتائج المختلفة كان لاستخدام تقنيـــة الكشـافات الجزيئية RAPD-PCR نتيجة أدق عن التقنيات الأخرى . وكذلك أمكن اســتنباط العلاقـــة الوراثية بين الخطوط الثلاثة اعتمادا على النتائج المستخلصة من النتائج المجمعة مـــن كـــل التقنيات المستخدمة والذى أظهر تشابه كبيرا بين سلالة سوهاج والمنزلة أكثر منه بالنســـبة لسلالة فوكى . أظهرت الدراسة أنه لعمل البصمة الوراثية لابد من الاعتماد على المســتوى الجزيئى والبيوكيماوى معا لإظهار معظم الاختلافات التى قد توجد بين وداخـــل ســلالات الأسماك .

٧- " التأثير الطفرى لبعض الملوثات الكيميائية الزراعية على بضع أصناف الزيتون المنزرعة "

للسيد / حمدى توفيق سويلم فراج للحصول على درجة الماجستير فى العلوم الزراعية (وراثة) من كلية الزراعة جامعة عين شمس عام ٢٠٠٠ تحت إشراف أ.د. على زين العابدين عبد السلام ، أ.د. سمير عبد العزيز إبراهيم ، أ.د. خليفة عطية عكاشة .

صممت هذه الدراسة لاختيار التأثير الطفرى لاثنين من المركبات الكيماوية الزراعية وهذين المركبين هما السماد الكيماوى كبريتات ماغنسيوم وسماد الماغنسيوم المخلبى وهما من الأسمدة الكمياوية المغذية للأوراق وقد تم اختيار ثلاثة أصناف زيتون (كلاماتا ، بيكوال ، منزانيللو) والمنزرعة بمزرعة معهد البساتين بمركز البحوث الزراعية بالجيزة لإجراء التجربة عليها .

وقد تم معاملة الأصناف الثلاثة بنوعين من السماد الماغنسيومى هما كبريتات ماغنسيوم وماغنسيوم مخلبى مع استخدام تركيزين لكل سماد وهما ١٠٠٠ ، ٢٠٠٠ جزء فى المليون ماغنسيوم وذلك عن طريق المعاملة بالرش الورقى للأشجار مرة واحدة فقط ثم جمع عينات الأوراق بعد المعاملة بـ ٧٢ ساعة . وتم دراسة تأثير هذين السمادين على المستوى البيوكيماوى وذلك بدراسة التأثير على نشاط الانزيمات الآتية EST , PX ، البيروكسيدز ، والاستريز .

كذلك اتجهت الدراسة لتقييم التباين بين ١٤ صنف للزيتون على مستوى البروتين ومستوى DNA .

وقد تمت الدراسة فى هذا البحث كما يلى :

١- دراسة التأثير الطفرى

تم دراسة تأثير السمادين على النشاط الانزيمى لانزيمين البيروكسيدز ، والاستريز . فى الثلاث أصناف كلاماتا ، بيكوال ، منزانيللو وقد أوضحت الدراسة عدم وجود أى تأثير على النشاط الانزيمى فى الانزيمين بين الثلاثة أصناف .

٢- دراسة التقييم للتباين بين الأصناف الأربعة عشرا .

أولا : على مستوى البروتين

أجرى التحليل البيوكيماوى للأربعة عشر صنفا الغير معاملة وأوضحت نتائج التحليل وجود اختلافات بين الأصناف تحت الدراسة .

ثانيا : على مستوى DNA

أجرى تحليل تفاعل سلسلة البلمرة PCR مع من البادئات وقد أظهرت النتائج وجود اختلافات بين الأربعة عشر صنفا .

وعلى ذلك يمكن استنتاج ما يلى من النتائج السابقة :

١-لا يوجد أى تأثير طفرى للسمادين وذلك لعدم وجود أى تأثير على الانزيمين تحت الدراسة وهذه النتائج توضح أن استخدام التسميد الورقى للزيتون هو استخدام آمن وذلك باستخدام التركيزات الموصى بها من جهة وزارة الزراعة .

٢-دراسة البروتين أعطت نتائج دلت على الاختلاف للأصناف .

٣-كذلك دراسة التحليل لسلسلة تفاعل البلمرة PCR أظهرت اختلاف مع الأربعة عشر صنفا مما يؤكد الاختلاف بين هذه الأصناف والذى يرجع بشكل أساسى الى طرق استنباط هذه الأصناف فى برامج التربية التى أدت لاستنباط تلك الأصناف .

REFERENCES

Alexander, M. (1991). Research needs in b. Environ. Scie. Technol. 25: 1972-1973.

Atlas, R.M. (1993). Bioaugmentation to enhance microbial bioremediation, in Biotreatment of Industrial and Hazardous Waste, edited by M.A. Levin and M.A. Gealt, McGraw-Hill, Inc. New York, pp. 19-37.

Baker, A.J.M. and R.R. Brooks (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metal elements-A review of their distribution, ecology, and phytochemistry. Biorecovery 1: 81-126.

Chakrabarty, A.M. (1981). Microorganisms having multiple compatible degradative energy generating plasmids and preparation thereof. U.S. Patent, 4, 259, 444.

Falahi-Ardakani, A., J.C. Bouwkamp, F.R. Gouin, and R.L. Chaney (1988). Growth response and mineral uptake of lettuce, and tomato transplants grown in media amended with composted sewage sludge. J. Environ. Hort. 6: 130-132.

Falahi-Ardakani, A., J.C. Bouwkamp, F.R. Gouin, and R.L. Chaney (1987a). Growth response and mineral uptake of vegetable transplants grown in a comp0osted sewage sludge amended medium. I. Nutrient supplying power of the medium. J. Environ. Hort. 5: 107-111.

Falahi-Ardakani, A., F.R. Gouin, J.C. Gouwkamp, and R.L. Chaney (1987b). Growth response and mineral uptake of vegetable transplants grown in a composted sewage sludge amended medium. II. Influenced by time of application of N and K.J. Environ. Hort. 5: 112-115.

Galli, R. and P.L., McCarty (1989). Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane, and tetrachloromethane by a Clostridium sp. Appl. Environ. Microbiol 55: 837-844.

Glasser, V. (1992). Strong growth in biotechnology market sectors predicted for 1991-2002. Genet. Eng. News. 12: 3, 6-7.

Gouin, F.R. (1993). Utilization of sewage sludge compost in horticulture. HortTechnol. 3(2).

Kai, G., A.S. Weber, and W.C. Ying (1991). Use of continuous flow UV-induced mutation technique to enhance chlorinated organic biodegradation. J. Ind. Microbiol. 8: 99-106.

Mondello, F.J. (1989). Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* Strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. J. Bacteriol 171: 1725-1732.

Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci. Am. 262: 56-65.

Nakatsu, C., J. Eng., R. Singh, N. Straus, and C. Wyndham (1991). Chlorobenzoate catabolic transposon Tn5271 is a composite class 1 element with flanking class 2 insertion sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8312-8316.

Nelson, M.J., J.V. Kinsella, and T. Montoya (1990). In situ biodegrada-tion of TCE contaminated groundwater. Environ. Progr. 9: 190-196.

Reev3es, R.D. R.,M. and R.R. Brooks (1983). European species of Thlaspi L (Cruciferae) as indicators of nickel and zinc. J. Geochem. Explorat. 18: 275-283.

Tseuda, N. and T. Iino (1987). Genetic analysis of a transposon carrying toluene degrading genes on a TOL plasmid pWWO. Mol. Gen. Genet. 210: 270-276.

Wallnoefer, P.R., W. Ziegler, G. Engelhrdt and H. Rothmeier (1978). Transformation of dinitrophenol herbicides by Azotobacter sp. Chemosphere 7: 967-972.

Fax, J.L. (1992). Assessing the scientific foundations of bioremediation. ASM News 58: 483-485.

الباب السابع
التكنولوجيا الحيوية والمبيدات ومكافحة الآفات

مقدمـــــــة :

خلال العشرين عاما الماضية حدث تقدم وتطور درامى فى البيولوجى . فى مجـــال البيولوجيا النباتية حدث تقدم مذهل فيما يطلق عليه بالبيولوجيا الجديدة والتى تـؤدى خـــلال المزارع المرستيمية للتضاعف الكلونى وزيادة المواد ذات الصفـــات الوراثيـــة الخاصـــة . خطوات الأنسجة المرستيمية أدت الى طرق زراعة الأنسجة والتى استخدمت لتنمية الخلايـا فى مزارع معلقة وفى صورة الكالاس . زراعة الأنسجة هذه وما يستتبعها من مقدرة علـــى خلق النباتات الكلية فتحت مجالا جديداً لبحوث بيولوجيا النباتات وأوجدت تطبيقات علميـــة وعملية متعددة . لقد استخدمت طرق زراعة الخلية بالتتابع لإنتاج البروتوبلاســـت والتـــى تستغل لإنتاج هجن من الخلايا الجسمية . لسوء الحظ فان هذه التكنولوجيا لم تحقق نجاحات فى اتجاه إعادة خلق المواد النباتية حيث مازالت هناك العديد من الصعوبات والتحديات فـــى حاجة الى الحل قبل أن نرى تطبيقات روتينية فى تكنولوجيا البروتوبلاست فـــى النواحـــى الزراعية . التطور الكبير الثانى الذى حدث خلال هذه الفترة تمثل فى إيجاد بلازميد البكتريا الفعال بيولوجيا فى الخارج . لقد أوضح هذا العمل إمكانية كلونة قطع من الدنا الوظيفى فـــى النظم البكتيرية باستخدام شرائط الاندوكلييز القاطعة المرتبطة فى بلازميدات البكتريا القادرة على التضاعف الذاتى داخل أنواع البكتريا . لقد استخدمت هذه التكنولوجيا تباعا فى كلونـــة البلازميدات البكتيرية المشتقة فـــى الـــورم المحفـــز لبكتريـــا التربـــة أجروبـــاكتيريوم . الأجروباكتيريوم ميكروب يحدث طبيعيا ذات مقدرة على إدخال "الدنا" الخاص بثبـــات فـــى كروموسوم الخلايا النباتية فى إنتاج الأورام أو البثرات التاجية . يستخدم هذا النظـــام الآن بكفاءة فى تناغم مع تكنولوجيا زراعة الأنسجة لإدخال الجينات الغريبة بنجاح فى الخلايـــا النباتية وخلق طرز جينية وراثية جديدة للنبات الكامل .

تأثير التكنولوجيا الحيوية على المبيدات الزراعية

هذا العنوان مأخوذ من مقالة د. Ernest G. Jaworski فـــى المؤتمـــر الســـادس للاتحاد الدولى للكيمياء التقنية والتطبيقية "IUPAC" والذى اتخـــذ عنوانـــا متمشـــيا مـــع متطلبات العصر وهو " علم المبيدات والبيوتكنولوجيا " الذى عقد فى مدينة أوتاوا بكندا فـــى الفترة من ١٠ – ١٥ أغسطس ١٩٨٦ . فى ذلك الوقت كـــان اتجـــاه اســـتخدام البكتريـــا

والتكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية فى مكافحة الآفات ووقاية النباتات فى مرحلة البداية والآن وبعد ١٤ عاما لنا أن نتصور مدى الجهد الذى بذل والتحديات التى قاربت على الحل والإنجازات التى تحققت لدرجة أن هذا الاتجاه أصبح الشغل الشاغل للباحثين فى هذا المجال . مع ذلك يظل الفرق بين اقترابات الدول المتقدمة والنامية شاسعا رغم وحدة الوسائل والطرق والمعرفة . ياسادة نريد جدية وعدم إدعاء معرفة إما تكنولوجيا حيوية ام لا لكل رجالاتها ومعاملها ومصارفها واستثماراتها .

التحول الخلوى فى النباتات Plant cell transformation

لكى تحدث تحول فى النباتات يجب أن تستخدم سلالات مختلفة من الأجروباكتيريوم توميناسينس التى تحتوى على البلازميد المحفز لحدوث الورم ويسمى (T1) الكبير لعدوى النسيج النباتى . يحتوى بلازميد T1 على شريحة من الحمض النووى DNA تسمى TDNA تستنسخ داخل الخلايا وتعبر عن عدد من الجينات المسئولة عن تخليق الهورمونات النباتية وتخليق نواتج تمثيل جديدة تمسى " أوبينات Opines " . عملية النقل والغمس لتحول T-DNA تتضمن تتابعات نيوكليتيدية متكررة (حواف T-DNA) والتى تعرف بنهايات شريحة T-DNA كما هو الحال مع الجينات الأخرى غير معروفة الوظائف التى تقع فى منطقة خاصة (منطقة VIP) خارج الـ T-DNA . لقد استخدمت مواصفات الأجروباكتيريوم ونظام بلازميد T1 فى تصميم عدد كبير من ناقلات التحول الجديدة . تحتوى الناقلات الوسطية على معلمات متخصصة مقاومة للمضاد الحيوى لإدخال الجينات الغريبة فى بلازميد T1 . صفات تكوين الأورام للأجروباكتيريوم تم التخلص منها من خلال إزالة الجينات المشفرة للهورمون النباتى ومن ثم استكمل تطوير طريقة فعالة لتحويل الخلايا النباتية خارج الكائن الحى .

لقد أمكن إيجاد الجينات الوهمية التى تحتوى على نيومايسين فوسفوترانسفيريز (NPT) ذات تتابع مشفر من المتحول البكتيرى Tn-5 المرتبطة بالتتابعات ٥` ، ٣` لجين نوبالين سينسيز المشتق من بلازميد T1 . هذا الجين مسئول عن المقاومة للمضاد الحيوى أمينوجليكوسيد " كاناميسين " والذى توجد له حساسية لدى الخلايا النباتية . المناطق التنظيمية ٥` ، ٣` لجين النوبالين سينسيز موصفة جيداً ومن المعروف أن هذا الجين يعبر عنه تركيبيا فى كل الأنسجة النباتية المتحولة بالبلازميد T1 .

حيث ان الاقترابات المباشرة للكلونة باستخدام بلازميد T1 ليست عملية يكون من الضرورى خلق ناقلات مكوكية مباشرة ووسطية . يتم تخليق الناقلات لكى تتكامل مع البلازميد T1 الموجود عن طريق الدمج أو بالتضاعف المستقل للبلازميد T1 كناقلات

انتقالية . لقد استخدم الناقل المتآكل لنقل عدد من الجينات الغريبة فى خلايا الأجروباكتيريوم. من أهم الصفات الضرورية لهذا البلازميد ما يتضمن احتوائه على شريحة دنا PBR 322 للتضاعف فى بكتريا E.coli . جزء من البلازميد T1 يحتوى على جين النوبالين سينسيز الوظيفى لتسهيل عملية توصيف وعمل مجاميع للخلايا النباتية المتحولة ، عوامل ومحددات المقاومة ستربتومايسين / سبكتيونومايسين من Tn7 للانتخاب فى الأجروباكتيريوم ، جزء من " الدنا " من بلازميد T1 آخر لإنتاج سلاسل متجانسة للدمج مع البلازميد أوكتوباين الموجود فى البكتريا أجروباكتيريوم ، رابط مخلق متعدد الروابط يحتوى على مواقع متميزة للقطع فى الجين الداخل وجين المقاومة الوهمى للكاناميسين (NOS/NPT II/NOS) . هذا البلازميد ومشتقاته أدخلت فى بكتريا أجروباكتيريوم بطرق الاشتقاق والدمج المتجانس بين البلازميد والبلازميد البرى من النوع الأوكتوباين T1 لإنتاج الرابطات Cointegrate – لقد أفاد هذا النظام فى دراسةا لتعبير الجينى وتوريث الصفات ولكنه لم يكن ذات جدوى كبيرة فى الإنتاج الروتينى للنباتات المتحولة . مشتقات بلازميد الصنف T1 جهزت لتكوين الرابط مع الناقل الوسيط أو المشتق. مضاعفة العبور بين البلازميد فى المدى العوائلى . مشتق PIIB633 , PRK290 أمكن شطب الجينات الخاصة بالتخليق الحيوى للهرومون النباتى للورم . تكوين الرابطات تؤدى الى إيجاد نظام غير عنيف وانتخابى منه T-DNA .

لقد تم تطوير طريقة للتحول خارج الكائن الحى "in vitro" باستخدام البروتوبلاست النباتى بالتحضين المباشر مع معلق خلايا البكتريا أجروباكتيريوم تومينيانس. يتم تجهيز البروتوبلاست من أنسجة أوراق النبات بواسطة الهضم التقليدى بالانزيمات . ترتبط البكتريا بالبروتوبلاست من خلال تجديد جدار الخلية أو بواسطة تقنية غير معروفة أو نقل T-DNA فى الخلايا النباتية . لقد تم تعريف هذه الخلايا بسهولة خلال ثلاثة أسابيع بالانتخاب للمقاومة للكاناميسين . لقد حدث تحسين طريقة بديلة لتفادى بعض مشاكل عزل وتحديد البروتوبلاست . فى هذه الطريقة يتم عدوى كل نصل الورقة بالأجروباكتيريوم وما يستتبع ذلك من تكوين الكالاس حول القرص مما يؤدى الى تجديد النبيتات تحت الظروف المناسبة . هذا النظام القابل للتكرارية "repro ducible" ينتج نباتات صغيرة متحولة خلال ٣-٤ أسابيع . استخدام أي من زراعة البروتوبلاست أو طريقة قرص الورقة تمكن من تحقيق إصلاح دائم فى الصفات النباتية والتعبير عن الجينات الأجنبية (المقاومة للكاناميسين) . بالإضافة فانه قد اتضح أن تقاوى النسل المشتقة من النباتات نفسها تورث المقاومة للكاناميسين فى نظام بسيط كما فى حالة قانون مندل .

التعبير الجينى Gene Expression

مع تطور نظام التحول والذى كان يسمح بالإدخال الوراثي والتعبير بالجين الغريب أصبحت هذه الوسية متاحة للتعبير الجينى بوجه عام . من أولى الدراسات تلك التى تضمنت العلاقة بين الأنسجة والضوء المتخصصة فى تنظيم تشفير الجين لتحت وحدة صغيرة من ريبيلوز -٥,١- بيس فوسفات - كربوكسيليز (RU Bp-ss) فى البسلة . الكلون الجينومى الذى يشفر جين البسلة Ru Bp-ss تم إدخاله فى ناقل مناسب وبعد النقل فى الأجروباكتيريوم تومينسانس أدخل فى خلايا نبات البيتونيا من خلال الزراعة المرافقة Co-cultivation . تحليل نورثرن و S1 لخلايا البيتونيا المتحولة أظهرت أن جين Ru Bp-ss تم التعبير عنه فى البيتونيا تحت سيطرة البادىء والمحفز الخاص به . بالإضافة الى ذلك فان التعبير الجينى يمكن السيطرة عليه بواسطة الضوء بطريقة مشابه لما حدث مع الجين الداخلى Ru Bp-ss فى البسلة . Ru Bp-ss فى البسلة يستعيد نظام التعبير الخاص للأنسجة فى الأوراق المشتقة فى نباتات البتونيا المتحولة المتجددة . فى دراسات متتابعة أخرى استخدم التعليم المشع ثم الترسيب المناعى للريبولوز -٥,١- بيس فوسفات كاربوكسيليز وجد مع الجيل 2-D أن البروتين غير المتجانس Ru Bp-ss فى البسلة يمكن فصلها من Ru Bp-ss للبيتونيا الداخلى . توضح هذه الدراسة أن بروتين Ru Bp-ss فى البسلة يتم تصحيحه فى الداخل بواسطة كلوروبلاست البيتونيا . البروتين Ru Bp-ss المشعع فى الداخل تم إرجاعه من الانزيمات الكلية التى انتخبت مناعيا مع تحت وحدات الجسم المضاد للبتونيا مما يوضح تحت الوحدات الصغيرة للبسلة قد تكون انزيم هجينى كامل مع تحت وحدات كبيرة .

فى دراسات متكاملة مع الدكتور روجر بيشى فى جامعة واشنطن اتضح أن نقل جينات بروتين تخزين البقوليات فى نباتات العائلة الصليبية يؤدى الى تراكم خاص لبروتين التخزين فى بذور النباتات المتحولة . التعبير المنظم لبروتين فول الصويا " الفا - كونجلايسينين" فى بذور البيتونيا تم الكشف عنه . هذا النموذج للتعبير عن بروتين التخزين سوف تسمح بتطوير التتابعات التركيبية المطلوبة لانتقال البروتين والجليكوسللة glycosylation وكذلك التتابعات التنظيمية الضرورية عن التعبير الخاص للبذور . هذه النظم ذات فائدة مؤكدة فى تحليل العملية والمحاكاة والوظائف الخاصة ببروتينات التخزين والتى يحدث لها تحوير خلال حدوث الطفرات لتغيير تركيب الأحماض الأمينية والقيم الغذائية . لقد حدث تعبير لاثنين من الجينات الثديية فى الخلايا النباتية باستخدام كلون cDNA المشفر لنظام α-human choriono-gonadoclropin (α-hGG) تحت

سيطرة فيروس موزايك القرنبيط والبادىء 35s وتعبير كلون الفأر cDNA المشفر لجين الميثوتريكسات ديهيدروفوليك ريدكتاز غير الحساس DHFR تحت سيطرة البادىء CaMV35s . لقد أدت نتائج ومردودات α – hgg , DHFR الفأر الى الاقتراح بالاستخدام العريض لنظام تحول بكتريا أجروباكتيريوم توميفسيانس لدراسة التنظيم الجينى والتعبير فى النباتات .

التطبيقات Applications

النباتات **Plants** : خلال السنوات السابقة أدت إتاحة نظم نقل الجينات الى موجدات جديدة هامة فى تنظيم التعبير الجينى ونقل البروتين فى النباتات . بالإضافة الى ذلك فانه اتضح أن استخدام جين واحد يمكن من إحداث تحمل فى النباتات لمبيد الحشائش أو الحشرات أو الأمراض الفيروسية . الجليفوسات : ن– فوسفونو ميثيل جلايسين هو المادة الفعالة فى مبيد ® Roundup وهو يثبط مسار التخليق الحيوى للمواد العطرية خاصة الإنزيم أنيول بيريفيل شيكميت –٣– فوسفات (EPSP) سينسيز . يشترك هذا الانزيم فى مسار المركبات العطرية فى تخليق الفينيل الانين والفيروسين والتربتوفان . لقد اتضح أن الجليفوسات يثبط بشكل خاص هذا الانزيم وأن الإنتاج المفرط لهذا الانزيم أو طفرة هذا الانزيم فى النسيج المتحول سوف تؤدى الى خلق تحمل لمبيد الحشائش . استخدام الجين الوهمى لتكوين بناء يتكون فى تبونيا EPSP سينسيز وكلون c DNA المربوط بواسطة البادىء CaMv 35s`5 ومناطق التنظيم `NOS 3 تحول خلايا البتونيا لإنتاج مفرط لانزيم EpsP سينسيز بمقدار ٣٠ – ٦٠ مرة . النباتات الناتجة من هذه الخطوط الخلوية أظهرت تحمل عندما تم رشها بمعدل ٠,١ رطل / أكر من مبيد الحشائش . الان توجد استراتيجيات مماثلة لخلق خطوط خلوية تتحمل العديد من مبيدات الحشائش الأخرى . حيث أن العديد من المحاصيل مثل لفت الزيت والطماطم والبطاطس والدخان والخس تتعرض فى الوقت الحالى للتحولات باستخدام نظام بكتريا الأجروباكتيريوم فأننا نتوقع ظهور نجاحات كبيرة فى المستقبل القريب وهذا ما حدث فعلا منذ عام ١٩٨٦ . يجب ألا ننسى أن هذه التكنولوجيا ذات مردودات متناهية فى دراسات التنظيم الجينى والتطور البيولوجى للنباتات أو الكائنات الدقيقة عالية الرقى بسبب السهولة النسبية التى مكنت هذه التكنولوجيا العمل على نظم منمذجة كما فى الدخان والبيتونيا .

أوضحت الدراسات المشتركة مع د. R.Beachy بجامعة واشنطن إمكانية استخدام نظام التحول لخلق نباتات مقاومة للفيروس . لقد تم هندسة جين البرتين المغلف لفيروس موزايك الدخان (TMV) فى بلازميد مشابه لذلك الذى استخدم فى دراسات التحمل

للجليفوسات . لقد اتضح أن نباتات الدخان والطماطم المتحولة بجين البروتين المغلف أظهرت مقاومة للعدوى بالـ TMV أو أظهرت تأخير (عدة أسابيع) فى ظهور أعراض الإصابة بعد العدوى . النباتات العادية يظهر عليها أعراض شديدة للمرض بعد العدوى بعدة أيام قليلة . حديثا فى ذلك الوقت أعلنت إحدى الشركات البلجيكية إمكانية إدخال جين توكسين بكتريا باسيلليس ثورينجبيسيز (B.t.) فى بلازميد Ti والتعبير عنه فى الدخان لحماية النباتات الناتجة من هجوم يرقات حرشفية الأجنحة مثل دودة قرون الدخان . أكد هذا الفتح الى الاقتناع بإمكانية حماية النباتات من هجوم الحشرات باستخدام تكنولوجيات التحول المتاحة الآن . للقارىء أن يتصور مدى ما أسفر عنه السباق المحموم بين الجهات البحثية فى كل أنحاء العالم والشركات فى إيجاد طرز نباتية مقاومة للآفات والاجهادات البيئية منذ ذلك التاريخ وحتى الآن .

الميكروبات Microbes : من المفيد الإشارة الى استخدام نظام تحول الميكروبات بدلا من النباتات بهدف زيادة الإنتاجية النباتية . نتناول فى هذا المقام تطوير البسيدوموناس فلوريسنسز المتحولة والتى تكون مستعمرات طبيعية حول الجذور أو المحاصيل الكبرى مثل الذرة وفول الصويا . لقد تم هندسة البسيدوموناس لحمل والتعبير عن جين توكسين الباسيلليس ثرونجنسنير أو جينات E.coli Laczy والتى تشفر لانزيمات بيتا-جلاكتوسيداز واللاكتوز برمييز . فى كلا الحالتان فان هذه الجينات ومنتجاتها وصفت جيداً وأتضح أنها غير سامة على الإنسان والحيوانات والنباتات . كذلك أمكن إدخالها بشكل دائم فى الكروموسوم باستخدام النظام ثنائى الأذرعة Tn7 . هذا النظام وكذلك طريقة Tn5 ثنائية الأذرع استخدما مع جينات توكسين .B.t أظهر وأكد تكرار قليل جداً تعقد أو حركة الجين من الكروموسوم . الآن لم يتم تقييم واختبار هذه النظم فى الحقل ومع ذلك أظهرت دراسات المعمل والصوب أن هذه الجينات عبرت عن نفسها بكفاءة دون فقد المقدرة على تكوين مستعمرات فى الجذور أو التنافس مع غيرها من الكائنات الدقيقة فى التربة . مازالت هناك حاجة الى تطوير أداء هذه الميكروبات تحت الظروف البيئية العادية فى الحقول وأنواع التربة خاصة ما يتعلق بالحصول على بيانات دقيقة عن إيكولوجية هذه الميكروبات . أن البيسدوموناس المعلم LacZy يعطى كائن حى مناسب لهذا الغرض بسبب احتوائه على أربعة خصائص تجعل من الممكن عزله من عينات التربة والكشف عن واحد بكتيره لكل جرام تربة . الصفات التشخيصية للبسيدوموناس المهندسة وراثيا تشمل صفات الفلوريسينية ، المقاومة الطبيعية للريفاميسين ، المقدرة على النمو فى بيئة لاكتوز بسيطة والكشف بواسطة الصبغة الملونة . الكائن المهندس هذا يقدم لنا نظام حساس ومتخصص يفيد كثيراً فى دراسات إيكولوجيا الميكروبات تحت الظروف البيئية الطبيعية .

الاستنتاجات واحتياجات المستقبل

لقد كانت وعود الحقبة التاريخية التالية تتمثل فى تحقيق تقدم معنوى فى التحوير الوراثى للنباتات بما فيها الفوائد المباشرة لمربى النباتات . بالطبع تركز معظم الفوائد العملية على الصفات المرتبطة بجين واحد مثل التحمل للمبيد الحشرى او الممرض الفيروسى أو لمبيد الحشائش . استخدام البيولوجيا الجزيئية الحديثة فى إدخال صفات وراثية جديدة فى النباتات أصبحت ذات اهتمام كبير فى تطوير نباتات مقاومة لمبيدات الحشائش وغيرها من المبيدات . الأمثلة الموجودة أمامنا الآن تشمل تطوير لفت الزيت مقاوم لمبيد الحشائش الأترازين ، تطوير ذرة مقاومة إيمازولينون ، تطوير نباتات مقاومة للسلفونيل يوريا ، تطوير نباتات مقاومة للفوسفوفوترايسين والجليفوسات . من بين ١٨٠ مبيد حشائش تستخدم فى الوقت الحالى على مستوى العالم لا يكون من الصعوبة الوقوف على مدى صعوبة والتكلفة العالية للحصول على منتجات ذات تأثيرات عريضة . النباتات المقاومة للحشائش قد تقدم طريق أو أسلوب فعال لدمج العلميات الزراعية المناسبة مع المنتجات الأخرى . يجب أن تعطى الأولوية للاستفادة من المنتجات ذات المميزات الهامة مثل الفاعلية الواسعة المجال وعدم الاختيارية وكل ما يحقق الأمان على البيئة خاصة من النواحى التوكسيكولوجية . السؤال المطلوب الإجابة عنه يتمثل فيما إذا كان إدخال الجينات سوف يقلل من إنتاجية المحاصيل وهذه الإجابة يجب أن تكون مبنية على معلومات من تجارب حقلية كبيرة وفى مساحات واسعة وتحت الظروف العادية والاجهادات البيئية والظروف الجغرافية المختلفة .

هناك نقطة أخرى تستحق الاهتمام وهى ما إذا كانت ستتطور ظهور أنواع من الحشائش مقاومة للمبيد . لذلك يجب العناية والأخذ فى الاعتبار إمكانية التهجين العبورى لأنواع الحشائش المقاومة للمبيد واحتمالات حدوثها . هناك بعض مبيدات الحشائش من ترسانة المبيدات المتاحة حاليا تجنبنا هذه المشكلة حتى لو حدثت . هناك تقدم إضافى يمكن حدوثه من إضافة أو دمج الصفات التى ذكرت أعلاه مع غيرها من الصفات العريضة المطلوبة والتى يمكن تحقيقها من خلال بيوكيمياء النبات والتحسينات التى يمكن تحقيقها فى هذا المجال . هندسة البروتين يمكن أن تسفر عن أول مراحل التطبيقات العملية فى عمل تحولات فى الأحماض الأمينية فى بروتينات البذور فى التخزين لزيادة محتواها من اللايسين (الذرة) أو الميثيونين (فول الصويا) . طرق تضخيم الجين قد تفيد فى تحسين إنتاجية مستويات البروتين فى المحاصيل الورقية وكذلك فى تطوير نظم إنتاج البروتينات النادرة باستخدام هذه التكنولوجيا . الطرق الأخرى لنقل " الدنا " فى الخلايا النباتية مازالت فى مراحلها الأولى ولكنها ذات مستقبل . هذه الطرق مثل التثقيب الكهربى أو الحقن الدقيق

أو المعاملة بأشعة الليزر والناقلات للفيروس تلقى اهتمام كبير وسوف تجد الطريق الصحيح للاستفادة منها . تعريف الجينات الهامة من الناحية الزراعية تمثل قلب هذه التكنولوجيا كى تعظم تأثيرها فى تربية المحاصيل المحسنة .

ماهو واضح فى الوقت الحالى نقص المعلومات الأساسية عن النواحى البيوكيميائية فى النظام النباتى . هذه المعلومات حيوية وأساسية لفهم المكونات الوراثية التى تشترك فى تحقيق الصفات المطلوبة مثل تحمل الجليد أو الحرارة أو الجفاف أو المعادن الثقيلة والأمراض والحشرات ... الخ . ما يتبقى بعد هذه المحاولات تغطية مجال التأثيرات الاجتماعية والاقتصادية للبيولوجيا الجزيئية الحديثة بعد استكمال التحسينات فى اتجاهات تكنولوجيا زراعة الأنسجة وإعادة الخلق ونظم التحول الجديدة (عناصر قابلة للنقل – الناقلات للفيروس – إدخال مباشر للدنا ... الخ) ، فهم تركيب الجين – التعضيدية والوظائف – الانتخاب – عزل وتوصيف الجينات ذات الأهمية الزراعية وتطوير تقنيات تربية النباتات .

هندسة كائنات التربة الدقيقة كى تقوم بتكسير وانهيار المبيدات

اكتشافات البيولوجيا الجزيئية الحديثة قدمت لرجالات الكيمياء الحيوية للمبيدات بعض الفرص المبشرة لزيادة فهم العمليات الوراثية التى تؤدى الى تخليق انزيمات الانهيار. تقدم هذه التكنولوجيا فرصة لمضاعفة الجينات التى تشفر الانزيمات المفيدة الخاصة بالانهيار فى الكائنات العائلة الهامة لحل عدد من المشاكل الزراعية الهامة . من المشاكل الراهنة ذات الأهمية التخلص الآمن والاقتصادى لبقايا المبيدات حتى يمكن تجنب تلوث الماء الأرضى . لقد قدر أنه فى عام ١٩٨١ ما يقرب من ٢٥٨٣٥ طن مترى من بقايا ٥١ مبيد موجود فى الولايات المتحدة الأمريكية فما بالنا عن الكمية الموجودة للآن بعد التوسع الرهيب فى إنتاج واستخدامات المبيدات . لقد أظهرت إحصائيات وكالة حماية البيئة الأمريكية أن ٣٨% كانت تمثل بقايا صناعة المبيدات والباقى يمثل مخلفات الاستخدام التجارى . على مستوى المستخدم العادى فانه من اكبر المشاكل صعوبة ما يتمثل فى التخلص الآمن وتحقيق سلامة المياه الأرضية من جراء غسل الأوانى وأجهزة تطبيق المبيدات . لقد أشار الباحث Wittaker الى أن المستخدم التقليدى للمبيدات ينتج ما بين ١٠٠ – ٤٠٠ لتر من مياه الغسيل الملوثة كل مرة من جراء غسيل وحدة رش واحدة وتنظيفها جيدا . مع الرش الجوى وجد أن تركيز المبيد فى مياه الغسيل لا تقل عن ٥٠٠ جزء فى المليون . جزء من هذه المخلفات تلقى فى أماكن تبخير الماء من التربة وهذه قد تساهم فى تلوث الماء الأرضى . لذلك هناك حاجة لطريقة بسيطة واقتصادية بعد احراؤها

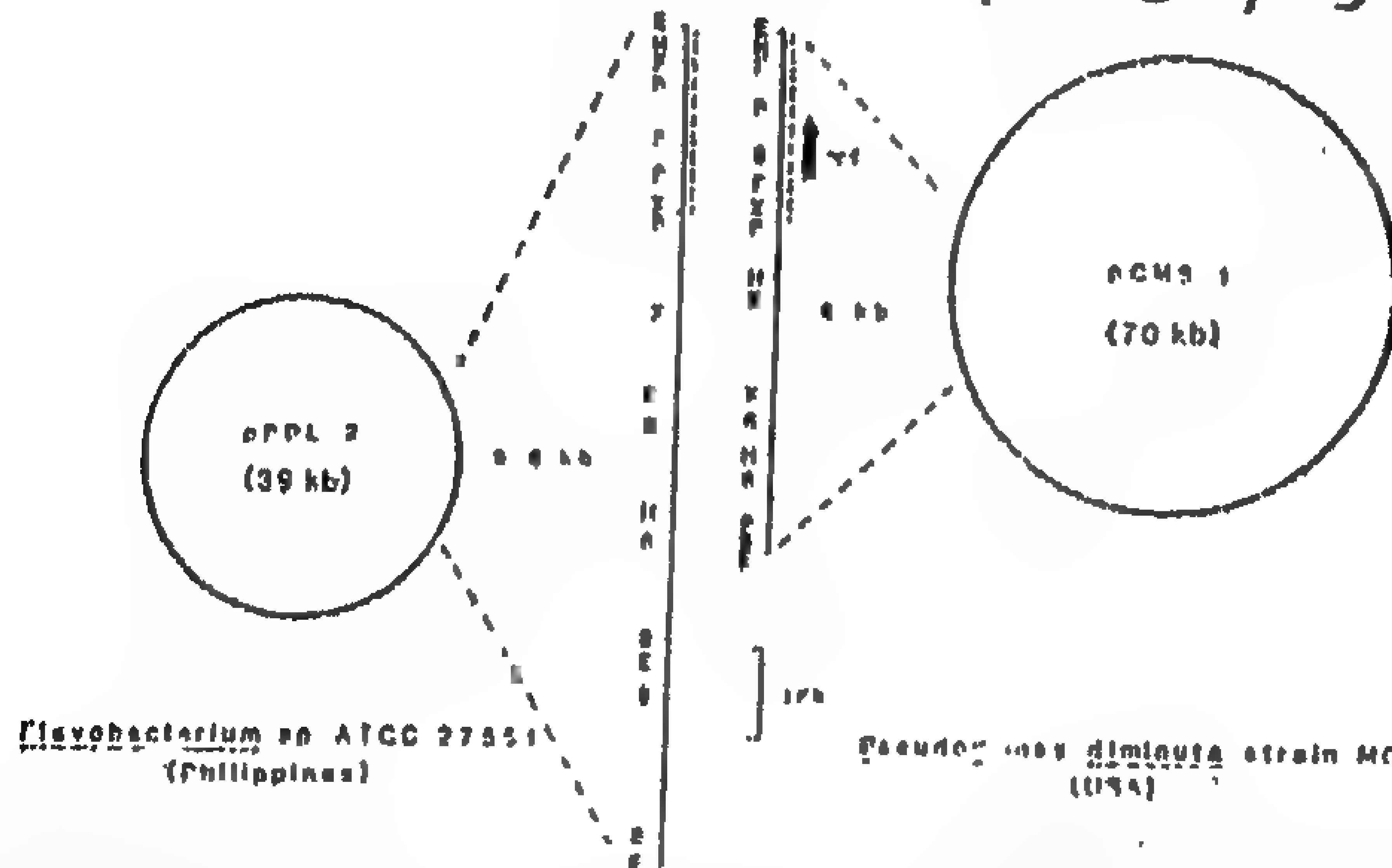
فى الموقع المراد تخليصه من المبيدات . تقدم الكائنات الدقيقة والمهندسة وراثيا آفاق مشجعة لحل المشاكل الزراعية الخاصة ببقايا المبيدات .

الانزيمات والجينات الهادمة للمبيدات

هناك العديد من المراجع تتعلق بالتحولات الميكروبية للمبيدات . فى العديد من الحالات تم تعريف الانزيمات البكتيرية المسئولة وتم توصيفها جزئيا . فى قليل من الحالات فان الجينات التى تشفر انزيمات الانهيار هذه تم وصفها . التقرير الأول عن الجينات البيئية خاصة المتعلقة بأنزيمات انهيار المبيدات ومسارات الانهيار ظهر منذ ما يزيد عن عشرين عاما ومازال عدد الجينات التى تكسر المبيدات والموصفة جيدا قليلة خاصة ما يلعب دور مؤثر في التخلص من بقايا المبيدات . فى الكثير من الحالات فان الجينات المسئولة عن انهيار المواد الغريبة Xenobiotic تتضمن المسارات الخاصة لانهيار المبيدات حيث وجد أنها تقع على بلازميدات البكتريا . هناك العديد من الحالات يكون فيها هذه المسارات مشفرة جزئيا بواسطة الجينات الكروموسومية . فى بعض الحالات فان جينات الانهيار قد تكون موجودة على الترنسبوسونات أو على قطع محددة من " الدنا " المتحركة والقادرة على الحركة بين بلازميدات البكتريا والكروموسومات . بالرغم من أن الموضع الأساسى لهذه الجينات قد لا يكون ذات موضوع فى الهندسة الوراثية لهذه الجينات فى المستقبل فى العوائل البكتيرية الجديدة فان موضع هذه الجينات ذات أهمية فى محاولة عدم التشويش على مصادر هذه الجينات . المقارنات بين جينات الانهيار المستقلة المعزولة والتى تشفر الانزيمات ذات الوظائف المشابهة التى تحدد مكانة هذه الجينات بين المجتمعات الميكروبية.

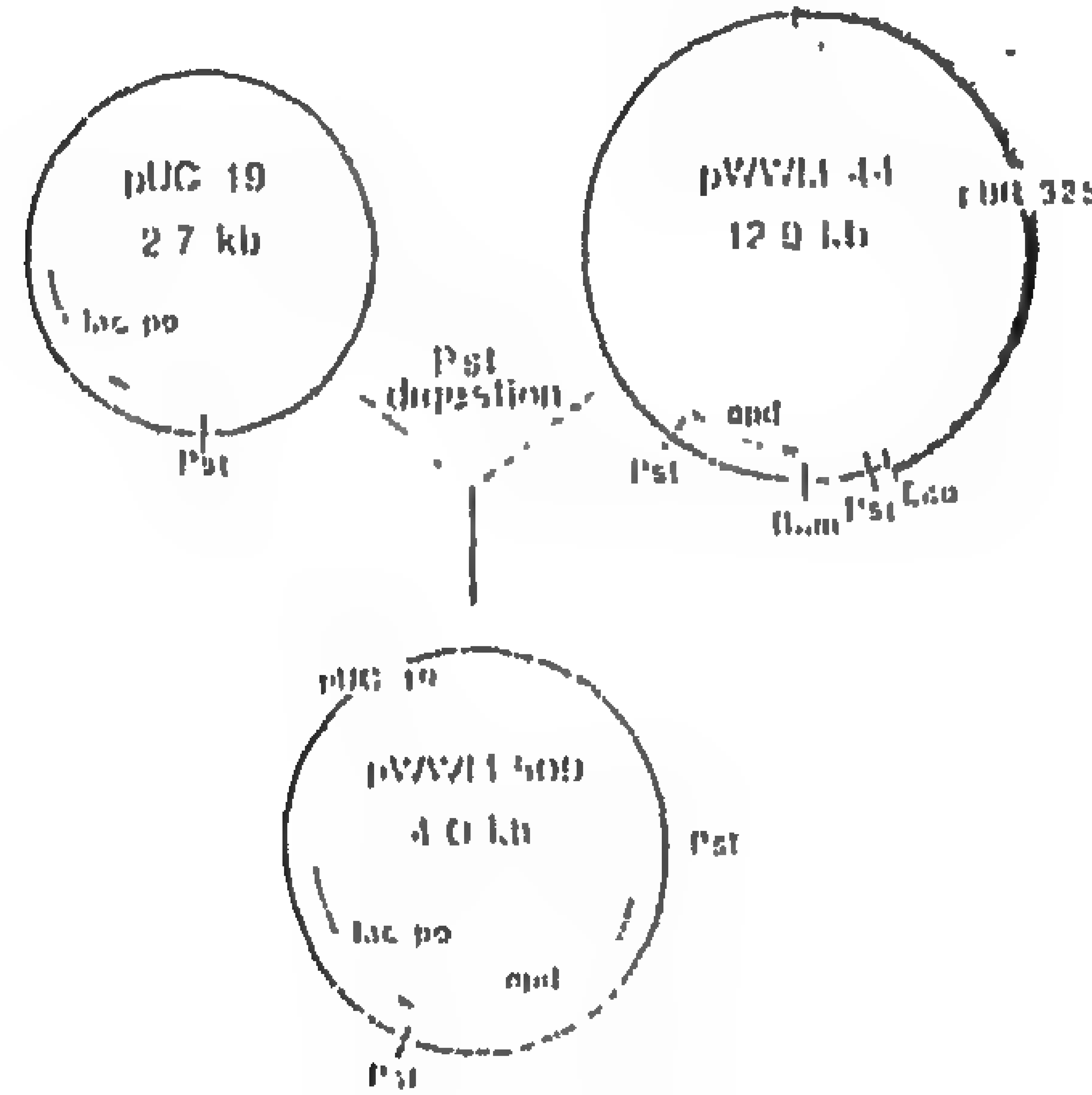
حتى الآن استخدمت عزلات طبيعية من البكتريا لهدم بقايا المبيدات وفى المستقبل سوف تستخدم هذه السلالات بدلا من السلالات المندمجة / المهندسة وراثيا لعدة أسباب . الأول كما ذكر أعلاه يوجد فى الوقت الراهن سلالات معروف عنها على المستوى البيوكيميائى ذات أنشطة مفيدة تجاه المبيدات وقد وصفت من النواحي الوراثية . بالطبع فان استغلال وتعظيم هذه الأنشطة سوف تجابه بتحديات استخدام السلالات المتوطنة حتى يمكن عزل الجينات المسئولة عن انهيار المبيدات . الثانى أنه حيثما يتم كلونة جينات الانهيار فى عوائل بكتيرية جديدة فان التعبير عن هذه الجينات يحدث بتكرارية أقل كثيرا فى العوائل الجديدة عما هو الحال مع العوائل المتوطنة الأصلية . لذلك فانه ولكي تستخدم هذه الجينات فى الكائنات المندمجة سوف يتطلب عوامل وقواعد تشريعية للتخليق تدخل فى الكائن لتحسين التعبير . فى النهاية فان استخدام العوائل الأصلية يمثل أهمية كبيرة فى التخلص من ملوثات المبيدات مع الكائنات الدقيقة المندمجة والمحورة وراثيا .

أوكسى – أوكسى داى الكيل ثيوفوسفات : على امتداد العشرة سنوات الأخيرة فان الانزيم المحلل للباراثيون E. 3.2.3 والجين الذى يشفره (يطلق عليه opd لانهيار الفوسفات العضوية) تم دراسته بشكل مكثف فى العديد من المعامل . خصائص الباراثيون هيدروليز تجعله مثيرا للاهتمام فى اتجاه تطبيقات التخلص من مخلفات وبقايا المبيد . الباراثيون هيدروليز لا يتطلب عوامل مساعدة أو مرافقة لإحداث النشاط كما أنه ثابت فى المستخلصات الخام . بالإضافة الى ذلك فان الانزيم له مدى واسع من المواد الوسيطة بين الداى الكيل ثيوفوسفات حيث اتضح أن له مدى واسع من الحموضة pH والحرارة ولايحدث له تثبيط بالمذيبات العضوية أو نهايات نواتج التفاعل . من المبيدات الحشرية الهامة التى تتحلل مائيا بواسطة هذا الانزيم مركبات الميثيل براثيون والديازينون والفينثروثيون والسيانوفوس والكلوربيريفوس والكومافوس . لقد أمكن كلونة جين opd من بلازميد البسيدوموناس ديمينيوتا ٧٠ كيلوبيز (Kb) (PCMSI) ويعبر عنها فى سلالات بكتيرية أخرى . حديثا أمكن كلونة جين opd من أنواع بلازميد الفلافوبكتيريوم (PPDL2) (ATC27551) . تجارب التهجين باستخدام الشرائح القاطعة التى تحتوى على جين opd البسيدوموناس ضد مناطق سوثرن للانزيم القاطع الذى يهضم بلازميد "دنا" الفلافوبلكتيريوم أوضحت أن جينات opd فى هذين المصدرين تقاسمت التجانس الكبير . مقارنة خرائط القطع الخاصة PCMS , PPDL2 أدي الى الاقتراح بأن جينات opd فى هذين البلازميدين كلاهما توجد داخل منطقة عالية الحفظ حوالى٢,٣ kb . فى هذه المنطقة لم يثبت وجود مواقع مقارنة (شكل ٧–١) .



شكل (٧–١) : خرائط مقارنة للانزيم القاطع لمناطق بلازميدات opd من أنواع بكتريا الفلافوبكتيريوم (PPDL2) (ATCC 2755) من البسيدوموناس ديمنيوتا (PCMS1) . الخرائط الحقلية تمثل منطقة قصيرة لكل بلازميد (٩,٦ kb من PPDL2 و ٦ kb من PCMSI) . الخطوط ذات الحروف عبارة عن مواقع حدوث فيها انقسام "للدنا" بواسطة الاندونيوكليز القاطع . الاندونيوكليز القاطع المستخدم كانت : -X-xhoI , S-salI , P-pst I , H . Hind III , B-BamH1 , E-EcoRI

فى العوائل الأصلية تم التعبير التركيبى عن جينات opd تحت ظروف نمو مختلفة. من جهة أخرى فانه فى العوائل البكتيرية الغريبة أو الأجنبية فان التعبير عن هذه الجينـــات يعتمد كلية على تتابعات المحفز الواقع على ناقل الكلونة . مثال ذلك كما هو موضــح فــى الشكل (٧-٢) من أنه فى بكتريا E.coli فان جين opd من الفلافوباكتيريوم لا يعبر عنـــه عندما يقع على الناقل PBR325 عندما تحدث تحت كلونة لشريحة قاطعة تحتـــوى علـــى الجين فى ناقل التعبير PUC19 يتم التعبير الخاص opd ولكنه تحت ظروف محددة يكـــون فيها تحفيز لبادىء Iac . الزيادة فى إنتاج هيدروليز الباراثيون فى العوائل البكتيرية الجديدة يمكن تحقيقها بسهولة بجعل واحضار تتابعات opd المشفرة بالقرب للبادئات التخليقية القوية أو بزيادة عدد جينات opd داخل كل خلية عوائلية .



Host/plasmid	Hydrolase Activity (μmoles/min mg protein)	Relative Activity
Flavobacterium sp 27551	[illegible]	1.0
HB 101/pWWM 44	< 0.0001	-
JM 105/pWWM 509	0.0008	0.0002
JM 105/pWWM 509 + IPTG	0.0868	0.0198

شكل (٧-٢) : تعبير opd فى بكتريا E.coli . شريحة ECO RI ٧,٣ kb تحتوى على جين opd مـــن أنواع الفلافوبكتيريوم . تم كلونة ATC 27551 فى بلازميد النـــاقل PBR325 لإنتـــاج بلازميد PWW 44 . لا توجد تعبيرات يمكن قياسها لهيدروليز الباراثيون عندما يوضـــع البلازميد فى سلالة E.coli ـ HB101 عند إزالة الشريحة PstI ١,٣ kb المحتوية علـــى PwwM44 ثم أدخلت فى البلازميد PUC101 (التى تحتوى على التتابعات التنظيميـــة لأوبيرون اللاكتوز lac Po) . لقد تحصل على تعبير هيدروليز الباراثيون فـــى ســـلالة E.coli (IM105) فقط عندما يوجد المحفز أيزوبروبيـــل ثيـــو - D-B - جلاكتوســـيد (IPTG ، محفز غير تمثيلى للتعبير عن أوبـــيرون لاكتـــوز) . أوضحـــت النتـــائج أن التتابعات التنظيمية لجين opd لا يمكن تمييزها بواسطة بكتريا E.coli .

الأحماض الهالوجينية : الجينات المرتبطة بالانزيمات النازعة للهالوجينات ذات السلسلة الكلورينية القصيرة أو الأحماض الاليفاتية الفلورينية قد تلعب دورا فى التخلص من البقايا بالرغم من أن هذه المركبات تكون عدد بسيط من المبيدات الحيوية فى عائلة المركبات التى تدخل فى نطاق مبيدات الآفات . المبيدات الهامة فى هذا القسم تتضمن مبيد الدالابون (٢,٢ – دايكلوروبروبيونات) و TCA (ترايكلوروأستيك آسيد) ومركب ١٠٨٠ (فلوروأسيتات) . لقد درست بعض الانزيمات الهادمة للهالوجينات بشىء من التفصيل مثل الهالوأستيات ديهالوجينيز (E.C. 3.8.1.3) و ٢- هالو أستيات ديهالوجينيز (E.C. 3.0.1.2.) . القسم الأخير من الانزيمات يقسم الى نوعان : الأول الذى يعمل على الفلورأستيات والثانى لا يعمل عليه . معظم انزيمات الهالوجينسيز ذات تخصص عالى من الناحية الفراغية وتقوم بإحلال الهالوجين بمجموعة الايدروكسيل وهذا يحدث فقط مع الأحماض الهالوجينية L-2 . لقد تم عزل انزيم من البسيدوموناس يساعد فى فقد الهالوجين للمشابهات الضوئية لمركب ٢- كلوروبروبيونات خلال تفاعل النوع SN2 . لقد تكونت لاكتات L&D من L , D كلوروبروبيونات على التوالى . هذا الانزيم يختلف عن كل الانزيمات الهادمة للهالوجينات والتى تتفاعل مع الكربون الهندسى فى أقارب المركبات الإجبارية .

لقد تم عزل بلازميد ٧٣ kb (PU 01) من سلالة Moraxella (B) التى تملك جينات تشفر انزيمى هالوأستيات ديهيدروجينسيز (EC 3.8.1.3) . هذا الكائن يستطيع إزالة الهالوجينات من كلا الفلورأسيتات والكلورأسيتات . الطفرة التى فيها البلازميد ٦٧ kb (PU001) تم عزلها وهى تعانى من نقص النشاط على الفلوروأسيتات ولكنها تظل ذات نشاط على الكلوروأسيتات . تحليل انزيم الاندونيوكلييز القاطع أدت الى الاقتراح بان PU011 عبارة عن طفرة شاطبة deletion المشتق من PU01 . لقد خلص الباحثون الى ان DNA ٦ kb الغائب من PU01 يجب أن يأوى الجين الذى يشفر الديهالوجينيز فلوروأسيتات .

لقد أظهرت بحوث مجموعة Warwick أن البسيدوموناس بيونيدا (PP3) يحتوى على زوجين مستقلين من جينات الديهالوجينيز والبيريميز (الديهالوجينيز المصمم I والبرمييز I والديهالوجينز II والبيرميز II) والتى تسمح بالنمو على الأحماض الهالوجينية العديدة . فى الوقت الراهن وحديثا لوحظ أنه عندما تنمو السلالة PP3 تحت ظروف محدودة من الكربون يحدث فقد في واحد أو أكثر من وظائف الجين خاصة مع المعدلات العالية جدا . على الأقل يوجد زوج واحد من الجينات (ديهالوجينيز I ، بريميز I) يقع

على عنصر ناقل أو قابل للنقل . الطفرات التلقائية التى تنتج مطفرات غير قادرة على انهيار الأحماض الهالوجينية تتضمن إقصاء هذا العامل . لقد لوحظ أن تكرارية هذا الإقصاء يتأثر بشدة بواسطة الاجهادات البيئية ومن ثم أدى هذا الوضع الى ضرورة استخدام جينات عالية الحركة فى أى عملية تخلص من المخلفات الخاصة بهذا النوع من المبيدات .

الانهيار الميكروبى لمبيدات الحشائش من أحماض الفينوكسى الكانويك : التمثيل البكتيرى لمبيدات الحشائش ٤,٢ – دايكلوروفينوكسى أسيتيك آسيد (٤,٢–د) ، ومبيد ٥,٤,٢ –ترايكلوروأسيتيك آسيد (٥,٤,٢ – تى) ، ٤– كلورو –٢– ميثيل فينوكس أسيتيك آسيد (MCPA) ، ٥,٤,٢ – ترايكلورو فينوكسى بروبيوتيك آسيد (سيلفكس) درس باستفاضة . يبدأ تمثيل هذه المركبات بهجوم تأكسدى على رابطة الايثر التى تربط بين جزء الحامض الاليفاتى للجزيئات مع الشقوق العطرية الأروماتية . الأحماض العضوية قصيرة السلسلة وممثلات الفينول الإحلالية يحدث لها انهيار متتابع حيث تستخدم بواسطة الكائن الحى كمصادر للكربون والطاقة . لقد تم تحديد الأساس الوراثى لانهيار ٤,٢–د فى Alcaligones eutrophus . الجينات التى تشفر انهيار الـ ٤,٢–د فى هذه البكتريا تم تشفيرها بشكل تام على بلازميد مفرد ٩٣ kb . الصفات الحيوية الطبيعية والوراثية لستة بلازميدات معزولة مستقلة تشفر انهيار ٤,٢–د و MCPA فى A.paradoxus و A.eutrophus تم وصفها . أربعة من البلازميدات المتحولة PJP3 و PJP4 و PJP5 و PJP7 ذات كتلة جزيئية ٨٢ kb . الطفرية الانتقالية للـ PJP4 بواسطة Tn5 , Tn1771 والدنا بالكلونة استخدمت لتكوين مواضع بلازميدات الجينات التى تشفر خمسة انزيمات هادمة تشترك فى انهيار ٤,٢–د حتى الان لم يتم فهم كامل للانهيار الكامل لمبيد ٥,٤,٢–تى بواسطة بسيدوموناس سيباسيا AC1100 تتضمن الجينات المشفرة البلازميد والكروموسومية . أظهر التهجين DNA/DNA أن بلازميد الدنا من سلالة AC1100 تشارك بتجانس مع تتابعات بلازميد الدنا من Alcaligenes التى تسبب انهيار ٤,٢–د .

الانهيار الميكروبى لمبيدات الكاربامات : الكاربامات عبارة عن قسم واسع من مبيدات الآفات التى تشمل مبيدات الحشائش ن– فينيل ، دايثيو ، ن– ميثيل وكذلك المبيدات الحشرية ن– ميثيل كاربامات . يبدو أن جميع مبيدات الكاربامات ذات حساسية لبعض صور الانهيار الميكروبى وأن التحلل المائى هو الطريق الرئيسى لفقد النشاط . لقد تمت الإشارة الى ثلاثة مداخل للانهيار من خلال انزيمات الهيدروليسيز البكتيرى وهى ذات أنشطة مختلفة على أقسام الكربامات المختلفة . لقد أشار Kearney الى عزل وتنقية الانزيم الذى يحلل عدد من ن–فينيل كربامات من بكتريا بسيدوموناس ستريانا التى تحلل

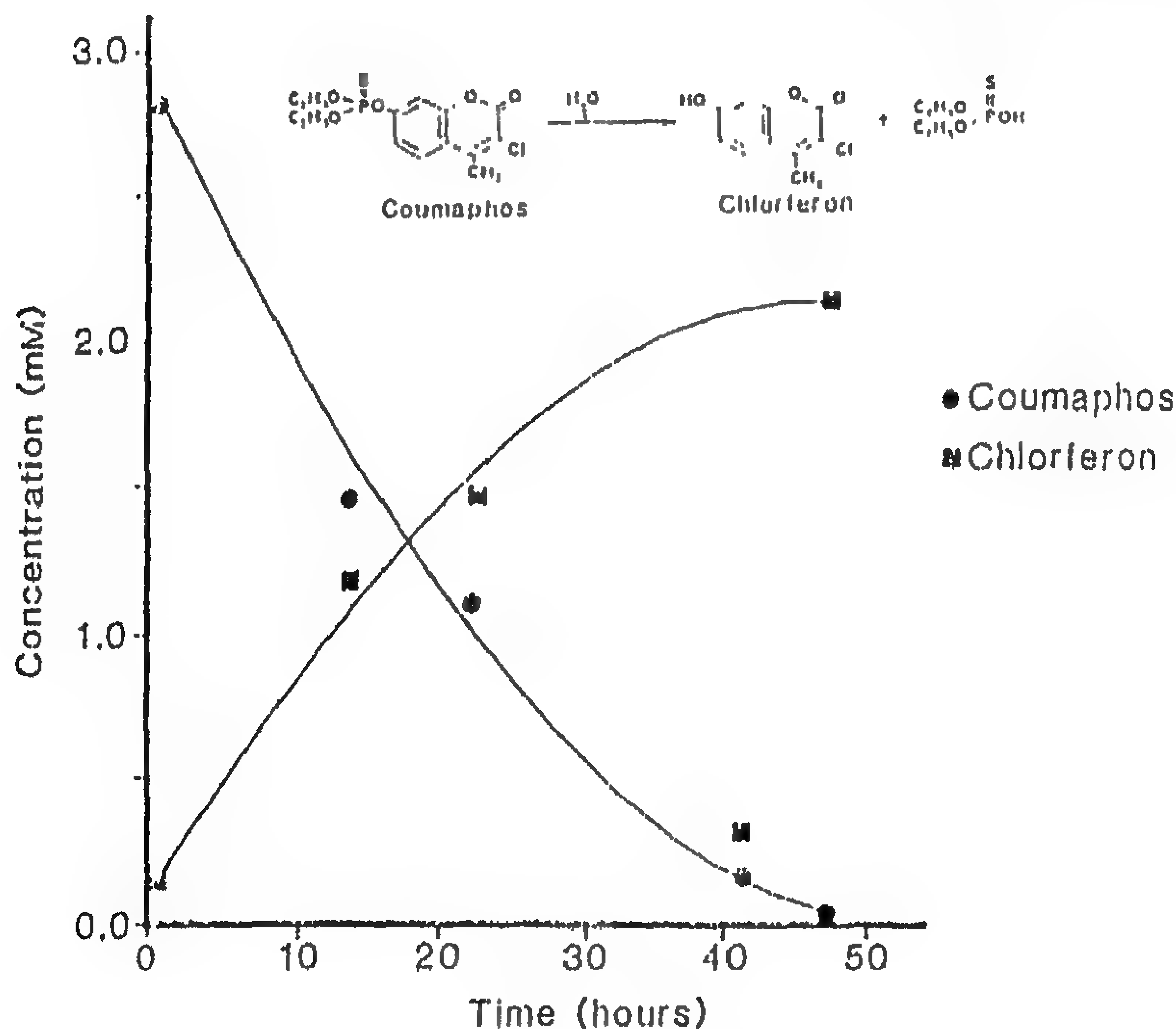
الكلوروبروفام. لقد أوضح Derhyshire وآخرون (١٩٨٦) عزل انزيم مفرد من سلالة اكروموباكتر WM111 والتى تحفز التحليل المائى للعديد من المبيدات الحشرية ن- ميثيل كاربامات . القليل معروف عن وراثية التحلل المائى للكربامات . لقد أشار تام ومعاونوه الى عزل بلازميد بكتيرى يشفر انهيار المبيد الحشائشى من مجموعة الثيوكربامات (EPTC) .

استخدام الكائنات الدقيقة فى التخلص من بقايا مبيدات الآفات

الكائنات التى تسبب انهيار المبيدات توضح أهمية وفوائد تطوير طرق قليلة التكلفة للتخلص من المخلفات المائية للمبيدات أو لتنظيم التربة عالية التلوث . لقد استخدم Kilbare وآخرون (١٩٨٣) بكتيرا البسيدوموناس سيباسيا المحللة لمبيد ٥,٤,٢-تى لتنظيف التربة المحتوية على ٢٠,٠٠٠ جزء فى المليون ٥,٤,٢- تى . لقد أمكن إزالة المركب حتى النقطة التى تمكن من نمو نباتات الخس طبيعيا فى هذه الأراضى التى كانت معاملة بالمبيد . لقد أمكن تطوير نظام للتخلص من المبيد الحشرى الفوسفورى كومافوس من مراقد مخلفات البقر . فى المعمل استخدمت البكتريا فلافوباكتير يوم Atcc2755 التى تنتج الباراثيون هيدروليز للتحليل السريع للكومافوس لمركبات أقل سمية . لقد استخدمت الأكسدة بالأشعة فوق البنفسجية والأوزون لإحداث أكسدة متقدمة لنواتج التحلل المائى . نواتج التحلل المائى التأكسدية تنهار بسرعة عندما تضاف للأراضى العادية . لقد نجح البحاث فى التخلص من مخلفات المركب 2285L فى أحد حقول ولاية تكساس من خلال التحلل المائى الميكروبى والأكسدة بالأوزون . مع المساحات الكبيرة تحتاج تجهيزات المكان كميات كبيرة من مزارع البكتريا مما يجعل هذه الطريقة غير عملية . للتغلب على هذه المشكلة تم عدوى المادة الأساسية بعشرين لتر من المزرعة النشطة وقويت بمصادر كربون ونتروجين مما يحفز الكائنات الدقيقة للنمو فى المخلفات . تحت الظروف فان الكائن يتطلب فقط ٤٨ ساعة لإحداث التحلل المائى الكامل للكومافوس الموجود فى المخلفات .

لقد استخدم البارثيون هيدروليز الانزيم لانهيار الديازينون فى نموذج يحاكى الانسكاب . عندما يضاف الانزيم للتربة أمكن هدم ١٠٠ جزء فى المليون ديازينون بنسبة ٩٧% فى خلال ٢٤ ساعة . فى دراسة أخرى تمت إضافة الباراثيون هيدروليز للتربة المحتوية على ٥٠٠ ، ١٠٠٠ ، ٥٠٠٠ جزء فى المليون ديازينون . لقد كانت نصف فترات الحياة للديازينون ١ ، ١,٢ ، ٥,٦ ، ١٢٨ ساعة على التوالى . عند مستوى ٥٠٠ جزء فى المليون كانت نصف فترة الحياة للديازينون ٩,٦ يوم بدون إضافة الانزيمات . مازالت هناك دراسات مطلوبة لمعرفة معايير التربة التى تؤثر على ثبات الانزيم . لقد وجد أن تجهيزات الباراثيون هيدروليز غير المتحركة يمكن أن تستخدم لتقليل تركيزات الباراثيون فى مياه

الصرف من المصانع وحتى ما يقل عن ٥٠٠ جزء فى المليون . يمكن للتكنولوجيا الحيوية أن تلعب دورا هاما فى مجالين من مجالات التخلص من بقايا المبيدات . الأول يتمثل فى استخدام الانزيمات مثل الباراثيون هيدروليز وقد ثبت كفاءتها فى تخليص المواقع التى يحدث فيها سكب للمخلفات من الملوثات ومن ثم يتطلب استخدام وسائل حيوية مساعدة على المستوى التجارى . لتحقيق هذا الهدف يلزم تحقيق الإنتاج التجارى لكميات كبيرة من الانزيم من خلال تضاعف الجين . الثانى يتمثل فى الإضافة المباشرة للكائنات الدقيقة فى المخلفات المائية وهى تحقق مميزات كبيرة فى النواحى الاقتصادية والأمان والفاعلية . إن إدخال جين الانهيار فى الكائن الدقيق العائل الى البيئة الملوثة يحقق ميزة تقويم الكائن المهندس وراثيا المقاوم للمذيب والحرارة والملوحة وغيرها فى عناصر الاجهاد البيئى فى المخلفات . تستخدم طرق متكاملة من الوسائل الطبيعية (UV – الأوزون) مع الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا .



شكل (٧-٣) : تحليل الكومافوس فى 228SL فى مخلفات فرشة الأبقار من خلال نمو الخلايا للفلافوباكتيريوم للباراثيون هيدروليز Atcc27551 . تم تقوية المادة الأساسية بعشرة كيلوجرامات زيلوز وخمسة كيلوجرام من سماد سلفات الأمونيوم وكذلك ١,٥ كجم من البوتاسيوم فوسفات أحادى القاعدة ، ٢ كجم ثنائى القاعدية .

REFERENCES

Bell, G.R. (1960). Can, J. Microbiol. 66, 325-337.

Don, R.R., A.J. Weightman, H.J. Knockmuss, K.N. Timmis, (1986). J. Bacteriol. 161, 85-90.

Fisher, P.R., J. Appleton and J.M. Pemberton, (1978). J. Bacteriol, 145, 798-804.

Friedman, D. (1984). Treatment and Disposal of Pesticidce wastes p. 18, Amer, Chem., Soc. Sym. Series 259, Washington.

Honeycutt, R., L. Ballantine, H. LeBaron, D. Paulson, V. Seim, C. Ganz, G. Milad, (1984). Treatment and Disposal of Pesticide Wastes p. 343, Amer. Chem. Soc. Symp. Series 259, Washington.

Karns, J.S., J.J. Kibane, S. Du Hag Upta and A.H. Chakrabarty, (1983). Appl, Environ. Microbiol. 45, 1697-1700.

Karns, J.S., W.W. Mulbry, J.O. Nelson and P.C. Kearney, (1986). Pesticide Biochem. and Physiol, 25, 211-217.

Kearney, P.C. (1965). J. Agric. Food. Chem., 13, 561-564.

Kearney, P.C., J.S. Karns, M.T. Muldon and J.M. Ruth, (1986). J. Agric., Food Chem., 34, 702-706..

Kilbane, J.J., D.K. Chatterjee and A.M. Chakraharty, (1983). Appl. Environ. Microbiol, 45, 702-706.

Motosugi, K., N.Eaki and K. Doda, (1982). J. Bacteriol. 150, 522-527.

Munnecke, D.M. (1979). Biotech. Bioengineer, 21, 2247-2261.

Ou L.T. and H.C. Sikka, (1977). J. Agric. Food Chem. 25, 1336-1339.

Scieber, J.N., (1984). Treatment and Diposal of Pesticide Wastes p. XI, Amer. Chem. Sco. Symp. Series 259, Washington.

Serdar, C.M., D.T. Gibson, D.M. Munnecke and J.HG. Lanchaster, (1982). Appl. Environ. Microbiol. 44, 246-249.

Slater, J.H., A.J. Weightman and B.C. Hall. (1985). Mol. Biol, Evol. 2, 557-567.

Tam, A.C., R.M. Behki and S.U. Khan, (1986). (Abstracts) Sixth International Cogress of Pesticide Chemistry, 66-68.

Whittaker, K.F., J.C. Sye, K.F. Wukasch, R.C. Squires, A.C. York and H. Kazimier, (1982). PB 82-255, 365, Oil and Hazardous Materials Spill Branch, MERL-Cincinnati, USEPA, Edison, N.Y.

الأجسام المضادة أحادية الكلونة للكشف عن آثار الكيميائيات

لقد تزايدت أعداد اختبارات المناعة للكشف عن آثار ومخلفات المبيدات فى السنوات الأخيرة . أظهرت هذه الدراسات أنه يمكن تحقيق الاختيارية فى الأجسام المضادة للارتباط بمدى واسع من الجزيئات العضوية الصغيرة (الهابتنات haptens) . تحليل المناعة الذى يشرك هذه الأجسام المضادة يقدم إمكانيات الحساسية الفائقة وقلة التكاليف والكشف السريع عن الملوثات . التحليل المناعى مناسب بوجه خاص للتقدير الكمى للمخلفات عندما تختلف طرق الكشف بالكروماتوجرافى (مثال البار اكوات والسيبرمثرين) وعندما تكون المركبات مشتقات متفاوتة التركيب والتأثيرات الحيوية البيولوجية (مثل الأفلاتوكسين والافيرمكتين وتوكسين الباسيلليس) أو عندما يكون أحد المشابهات فقط محل الاهتمام (مثل الديوكسين والاس بيوالليثرين) . سوف نتناول فى هذا المقام الخواص المتميزة للأجسام المضادة أحادية الكلونة (Ilabs) عندما تستخدم فى تحليل المخلفات مع التركيز على استخدام الأجسام المضادة ضد الديوكسين كمثال . لقد شهدت السنوات العشر الأخيرة نمو مضطرد فى إيجاد وتطويع واستخدام طريقة الأجسام المضادة أحادية الكلونة Mabs . هذا الاقتراب وتكنولوجيا تطويره ذات مميزات وفواصل عديدة عن السيرولوجى التقليدى والتى لها دور معنوى وإيجابى فى تطوير التحليل المناعى للاستكشاف البيئى للمخلفات . الباحثين أو العاملين غير ذوى الدراية والإلمام بهذا المجال يشعرون بالإحباط والتشويش من الوهلة الأولى من جراء الوقت الطويل والعمالة المرتبطة بهذه الطريقة ومن ثم يتوارد الى أذهانهم السؤال التقليدي عما إذا كانت طريقة الأجسام المضادة وحيدة الكلونة تختلف حقا عن مضاد السيرم " الأنتيسيرا " عديدة الكلونة بما يستدعي ويستحق بذل مجهودات إضافية واستخدام مصادر أخرى بإمكانيات جديدة . الرأى الخاص لكاتب المقال عن جدوى وأهمية طريقة Mabs ليست متعلقة بالتكاليف فقط ولكنها ضرورية لتحقيق القياسية فى طرق التحليل المناعى ذات الهاتبن المتخصص والتى يمكن أن تستخدم لتحليل أعداد كبيرة من العينات فى العديد من المعامل المختلفة .

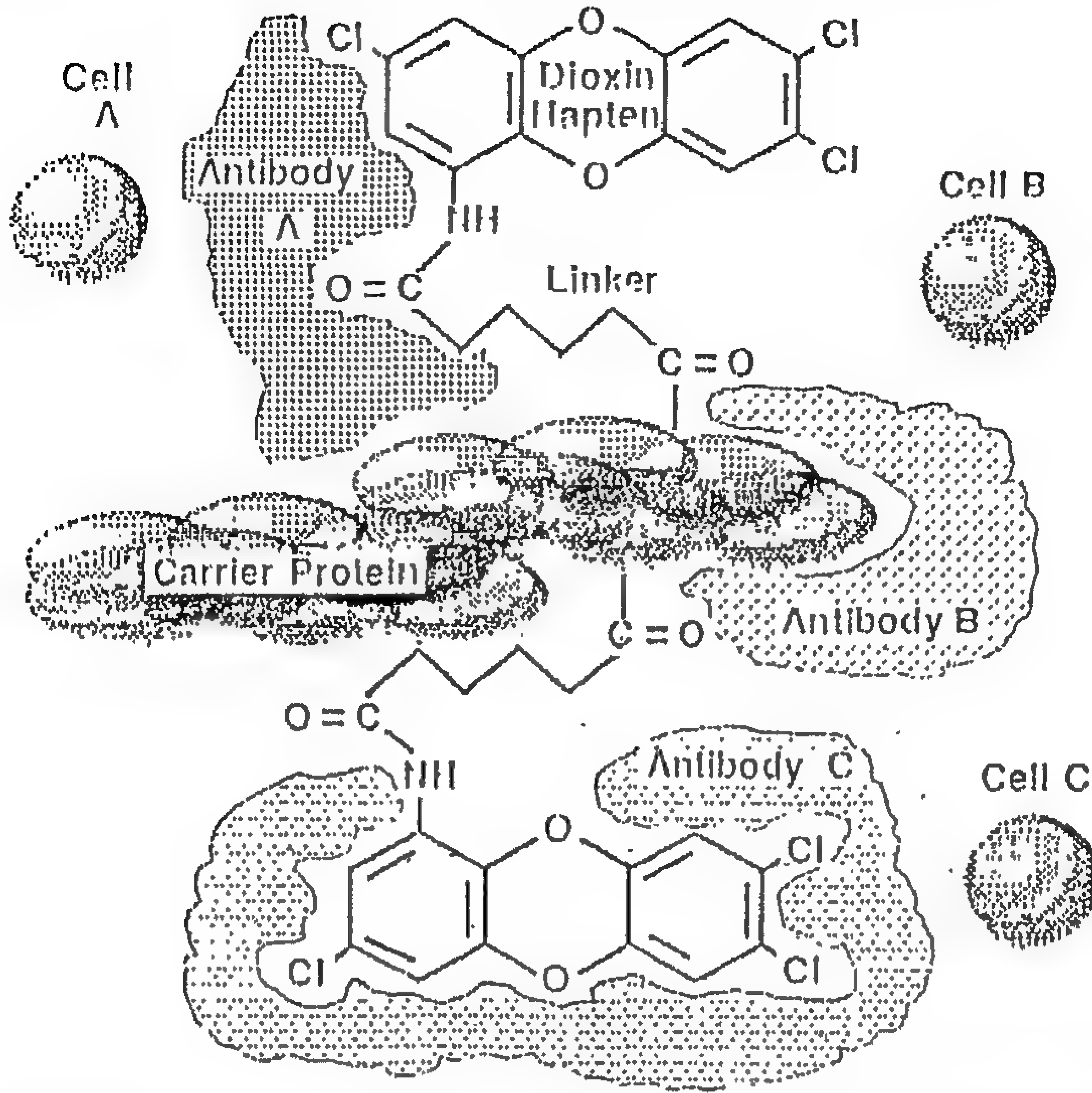
التحليل بالأجسام المضادة تحقق المقدرة الطبيعية لنظام المناعة بما يمكن من الاستجابة لعدد غير محدود من الانتيجينات الظاهرة . الشكل (٧-٤) يوضح ملامح عديدة من الاستجابة المناعية . الجزيئات الصغيرة مثل الديوكسينات لا تظهر استجابة للأجسام المضادة إذا حقنت منفردة . من جهة اخرى فان هذه الجزيئات يحدث لها اشتقاق بحيث تصبح جزىء حامل وفى العادة يكون بروتين . إن اختيار موقع الارتباط والكيميائية ذات تأثيرات معنوية بسبب أنها سوف تؤثر على مجال ومدى الأجسام المضادة الناتجة . فى الحالة التى أشير إليها فى الشكل تم إدخال مجموعة متفاعلة فى جزىء الديوكسين من خلال

تخليق ١- أمينو - ٨,٧,٣ - تراى كلورو-دايبنزو ديوكسين (A-tri CDD) وهذا المركب الكيميائى يحدث له تحول الى بروتين سيرم البيوفين البوفين (BSA) من خلال ارتباط مع الطرق المنشورة .

طبيعة الكلونة فى الاستجابة المناعية

من الصفات والملامح المحورية للاستجابة المناعية بالأجسام المضادة ما يتعلق بقواعد الكلونة (مرجع ١٢) . كل الفقاريات فيها البيتا - خلايا ليمفاوية -B "Lympbocytes" التى تملك مستقبلات مناعية جلوبيوليفية فى أغشيتها الخارجية وكل خلية -B تملك مستقبل واحد يتسم موقعه المندمج بخواص خاصة بهذه الخلية . بعد المناعية فان هذه الخلايا B-calls تكون قادرة على ربط مادة أو جين المناعة "immunogen" وتحدث تكبير وإخراج أو إفراز للأجسام المضادة مع نفس الموقع المندمج كما هو الحال مع مستقبل غشاء الخلية . لذلك فان تضاعف الأجسام المضادة فىالسيرم يعكس تضاعف الخلايا فى المقابل حيث كل إفراز يقابله واحد جسم مضاد فقط .

الشكل (٧-٤) يوضح ثلاثة خلايا -B والأجسام المضادة المقابلة التى تفرز كاستجابة للهابتين - وبروتين المناعة hapten – protein immunogen . كلونة كل هذه الخلايا سوف توجد فى الحيوان الذى أصبح منيعا . سوف يحتوى السيرم على كل هذه الأجسام المضادة ومن ثم يطلق عليها الانتسيرم " عديدة الكلونة polyclonal antiserum " بعض الأجسام المضادة (مثل -C) تتفاعل مع الهاتبين وحده والأخرين (مثل B) تتفاعل مع البروتين الحامل ومازال يتبقى أفرين (مثل A) تتفاعل بعض خلائط الهابتين والرابطات و/أو البروتين . هناك أعداد مهولة من خلايا B التى تفرز الأجسام المضادة لأشياء كثيرة لمكونات فى مادة المناعة . الأجسام المضادة(C) فقط تفيد فى التحليل المناعى لهابتين وفصل الأجسام المضادة المطلوبة فى الأجزاء غير المرغوبة يمثل فى الغالب صعوبات . طرق الفصل تعتمد فى الأساس على الكروماتوجرافى وهذا قد يحطم أو يغير من خصائص الأجسام المضادة المطلوبة . الأجسام المضادة مثل (A) موقع اندماجية معقدة تفوق فى العديد التخصص الهابتينى مع الأجسام المضادة عندما يكون الهاتبين ذات وزن جزيئى أقل من ٥٠٠ . الفشل فى تنقية الأجسام المضادة التخصصة المضادة للهابتين قد يعيق إجراء التحليل المناعى .



شكل (٧-٤) : الاستجابة المناعية لهابتنات الدوكسين المرتبطة بالبروتين الحامل . يتم إنتاج ثلاثة أجسام مضادة مختلفة بواسطة ثلاثة خلايا (B) . الأجسام المضادة A,B غير مناسبة للمحاليل المناعية لأنها تتفاعل مع البروتين الحامل و/أو ذراع الارتباط . الجسم المضاد (C) مناسب لأنه يتفاعل مع هابتين الديوكسين .

التحليل المناعى المبنى على السيرم المضاد عديد الكلونة يتطلب تنقية الجسم المضاد (٢) من بروتينات السيرم الأخرى. بالنسبة للأجسام المضادة وحيدة الكلونة يتطلب كلونة الخلية (E) وزراعتها لإنتاج الجسم المضاد (٢) .

الخلايا المعطلة Hybridomas والأجسام المضادة وحيدة الكلونة

على عكس مضاد السيرم عديد الكلونة فان تجهيز الأجسام المضادة وحيدة الكلونة لاتتضمن عزل الأجسام المضادة المتخصصة للهابتين من بروتينات أخرى فى السيرم ولكن عزل الخلايا المقابلة التى تفرز الأجسام المضادة المتخصصة للهابتين . بعد حدوث المناعة تزال خلايا (B) وتحفز كى تنمو فى مزرعة من خلال تعطيلها بخلايا ورمية التى هى نامية فعلا فى الخارج in vitro . الخلايا المندمجة هذه Fused cells يطلق عليها hybridomas وهى تستطيع أن تنمو فى مزارع وتفرز أجسام مضادة . تفاصيل زراعة

هذه الخلايا موجودة فى مصادر أخرى (المراجع ١٤ ، ١٥) . ما هو مهم من وجهة نظر الاستكشاف البيئى أن كل مستعمرة تبدا تنازليا من خلية فردية ومن ثم تنتج الجسم المضاد الخاص بها ذاتيا مع تفاوت غير محسوس أو عدم تفاوت فى القابلية للهابتين الخاص كذلك لا يوجد تفاوت فى الاختيارية بين الهابتينات المرتبطة . خلايا الهيبريدوما (المعطلة) يمكن أن تنمو بشكل لا نهائى فى المزرعة ويكون الجسم المضاد الناتج متجانس وهو مايمثل وسيط قياسي يمكن توزيعه على العديد من المعامل .

إتباع أسلوب الإندماج Fusion يمكن من إنتاج آلاف من الخلايا المعطلة "هيبريدوماس" والتى تحتاج للتقييم لتعريف العدد القليل من الكولونات المناسبة للتطور المستقبلى . أهمية خطوة التقييم هذه لا يمكن التغاضى عنها . يجب أن يكون تقييم الفروق Screening سريعا بما يسمح بتقييم كل الكولونات فى يوم واحد كما يجب أن يكون دقيقا لأن الخطأ فىالتقييم سوف يؤدى الى إهدار الوقت على كودونات غير مبشرة فعلا . لذلك فان التقييم الأولى يجب أن يكون متوافقا تماما ويحاكى الاستخدام الجارى للجسم المضاد . مثال ذلك ان الاختبارات المناعية للجزيئات العضوية الصغيرة غالبا ودائما تتطلب أن الجسم المضاد يمثل الهابتين الحر فى المحلول . لذلك فان اختبارات التقييم المبكرة عن قابلة mab's لملائمة الهابتين الحر فى غياب البروتين الحامل ضروريا فى تعريف أفضل الكولونات . التغيرات المحسوسة فى ظروف التحليل قد تغير الاختبار الذى من خلاله يتم اختيار أكثر الأجسام المضادة المطلوبة . الاختبار الجيد التصميم سوف يؤدى الى تعريف كولونات الخلايا التى تفرز الأجسام المضادة مثل (٢) فى الشكل (٧-٤) . مزارع هذه الكولونات قد تتسع ومن ثم يمكن تحديد خصائص وصفات الأجسام المضادة .

نحن نستخدم طريقة تحليل الانزيم المرتبط بمادة المناعة "Elisa" وهى اختصار Enzyme – linked immunosorbent assay للتفرقة وتوصيف خصائص الارتباط للـ Mab's وكذلك فى تقييم وتحليل المناعة الملائم . فى طريقة الاليزا التنافسية فان الجسم المضاد يتوزع بين مركب حر فى العينة وهابتين مع بروتين مرتبط أو متحول مدمص على قاعدة دقيقة بلاستيكية . كمية الجسم المضاد المرتبطة بالهاتبين غير المتحرك يتم تقديرها حينئذ من خلال الكشف عن النشاط الانزيمى الذى هو فى ارتباط مع الجسم المضاد . صور الاليزا التنافسية تكون بسيطة وسريعة . هى طريقة كمية وحساسة يمكن أن تستخدم لتقييم أى جسم مضاد يرتبط بصبغة متخصصة وكذلك فى حالات استخدام الجسم المضاد مع عينات غير معروفة .

بمجرد عزل الكولون يجب توصيف اختيارية جسمه المضاد بـــالتفصيل . ارتبـــاط الانتيجين والجسم المضاد يعتمد فى البداية على عوامل فراغية تؤثر على مطابقة وملائمـــة الانتيجين على الموقع المستقبل للجسم المضاد . من أحد المميزات الـــ Mab's أن الأجسام المضادة ذات الاختيارية المختلفة يمكن أن تختار لاستخدامات متخصصة . للتوضيح نشـير الى أن بعض الأجسام المضادة للديوكسين قد تميز الديوكسين من مركـــب ٥,٤,٢– تـــراى كلوروفينوكسى أسيتيك آسيد ولكنها قد تتفاعل عبوريا مع مركبات البيفينيل عديـــدة الكلـــور PCB's . هذه الأجسام المضادة يجب أن تكن مناسبة للتحليلات المناعيـــة للكشـــف عـــن الديوكسين فى المناطق التى عوملت بمبيد ٥,٤,٢–تـــــى . الأجســـام المضـــادة متعاكســـة الاختيارية او التخصصية تستخدم بشكل مناسب فى الكشف عن الديوكسينات فى المواقـــع الملوثة بمركبات PCB . توصيف الاختيارية فى Mab's تؤدى الى تعريف طبيعة الموقـع الخاص بالاندماج أما اختيارية مضاد السيرم عديد الكلونة يعكس مجموع المواقع المندمجـــة فى كل الأجسام المضادة الناتجة من مجموعة الكولونات فى الحيوان . مجموعة الكولونـــات هذه تختلف من حيوان لآخر كما أنها تتغير مع الوقت فى أى حيوان .

الأجسام المضادة وحيدة الكلونة للديوكسين

لقد تم تعطيل خلايا الطحال من سبعة جرذان منيعة للديوكسين BSA تم إجراء تقييم أولى للهيبريدوماس الناتجة . البطارية الأولى فى الاختبارات التى أجريت انتخبت الأجســـام المضادة التى تميز أو تفرق بين أو كلا A-triCDD-BSA والبيومين ســيرم الأرنـــب – A-tri CDD (A-tri CDD-RSA) من BSA , RSA هذه الكولونات التى أمكن تعريفها والتى تتفاعل أجسامها المضادة مع الديوكسين فى استقلالية عن البروتين ولكنها لا تتفـــاعل مع البروتين نفسه . لقد أدى هذا الاختبار الى تحديد ٢٥ كولون كما هو موضح فى جـــدول (٧–١) . اختبار التقييم التالى يتطلب ان الجسم المضاد يتفاعل مع مشتق حر : الرابط مـــع A-tri CDD ، A-tri CDD ، ٨,٧,٣,٢– تتراكلورو داينزوديوكسين (TcDD) . هـــذه المركبات تتراوح من الهابتين المستخدم فى مادة المناعـــة immunogen وحتـــى قريـــن الديوكسين ذات التأثيرات التوكسيكولوجية (TcDD) . القيم الموجودة فى جـــدول (٧–١) تمثل نقاط التثبيط النصفى I50's للمركب . لقد تم تحديد وتقييم كل مستويات الاختياريـــة . لقد وجد أن ثلاثة كولونات من الفأر ٣–٧ تتطلب وجود الذراع الرابط . غالبية الكولونـــات (مثل كولون 47 Ibr -11) تميز الديوكسين سواء إذا كان به ذراع الربط أو مجموعة أمينية فى الوضع 1 # ولكنها لا تتفاعل مع TcDD . لقد تم تعريف خمســـة كولونـــات (-DD 1,3,4,5 and 6) تستطيع التفاعل مع TcDD .

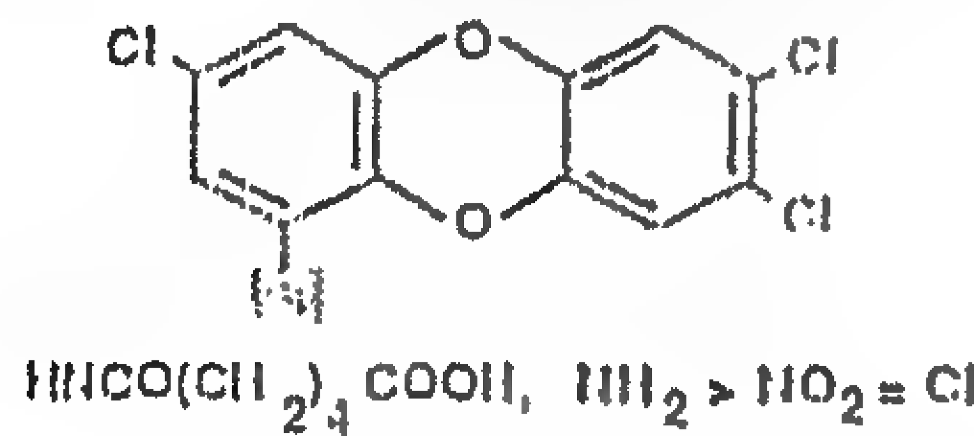
العديد من ملامح الطبيعة الكولونية لاستجابة المناعة تبدو واضحة من النتائج الموجودة فى الجدول (٧-١) . مثال ذلك أن مجال الكولونات الموجودة فى كل حيوان مختلفة . هذه نتيجة شائعة توضح مدى الاختلافات فى الاستجابة المناعية حتى بين أفراد نفس السلالة المهجنة . من بين الاستراتيجيات الاستفادة من ميزة هذه الاختلافات للتفرقة بين سيرم العديد من الجرذان بسبب ندرة الأفراد التى تنتج الأجسام المضادة الفعالة والمناسبة . الخلايا التى تنتج الجسم المضاد فى هذه الفئران قد يعطل موتها immortalized على نفس منوال الهيبريدوماس . إختبار السيرم هذه يرفض الفئران ٣-٧ من التعطيل . مقارنة بالفئران يكون من الصعب إجراء الاختبارات على عديد من الأرانب أو الماعز أو حيوانات كبيرة اخرى لاختيار الأفراد التى تنتج أفضل مجموعة من الأجسام المضادة عديدة الكلونة .

يجب أن يؤخذ فى الاعتبار كذلك خصائص السيرم عديد الكلونة فى هذه الجرذان . على سبيل المثال فان الجرذ 11-1a ينتج العديد من الأجسام المضادة ذات مواصفات مختلفة ولكن هيبريدوما واحد فقط من تسعة تميز مركب TcDD . على فرض وجود نفس التركيز النسبى للأجسام المضادة فى السيرم حيث ينتج الهيبريدوماس فان الديوكسين سوف يثبط فقط ارتباط ٩/١ من الأجسام المضادة فى الانتيسيرم 11-1a فى الاليزا التنافسية . مع انتخاب الكولون نصبح قادرين على الحصول على كميات كبيرة من الجسم المضاد النقى الذى يوجد بنسبة ضئيلة جدا قياسا الى الأجسام المضادة الموجودة فى مجموع الجرذان . تسمح الهيبريدوماس بعدم موت الخلايا التى تنتج الأجسام المضادة بندرة والتى قد يكون لها صفات اختيارية ذات قيمة ولكنها تمثل مكون صغير جدا فى السيرم متعدد الكولونات . الأجسام الخمسة المضادة لمركب TcDD والتى أختبرت للكشف عن نشاطها مع العديد من المركبات موجودة فى الشكل (٧-٥) مع إثنان من Mab DD-3 والذى يمثل مجموعة من الأجسام المضادة . تتفاعل Mabs مع أقران الديوكسين فقط والتى بها مستويات متوسطة فى الكلورة بما فيها الأقران عالية السمية ٢,٣,٧,٨ – TcDD ، ١,٢,٣,٧,٨ – نبتا CDD ، ٢,٣,٧,٨ – تتراكلورو داى بنزوفيورون (TcDBF) ، ٢,٣,٧,٨ – تترابرمو دابنزوديوكسين (TBDD) . على الجانب الأخر فأنها لا تتفاعل مع الأقران الأقل سمية مثل أوكتاسى دى دى ، الايدروكربونات غير الكلورينية . هذه الأجسام المضادة تعتبر مواد نموذجية لاختبار وجود مركب التى سى دى دى فى الأوساط المختلفة .

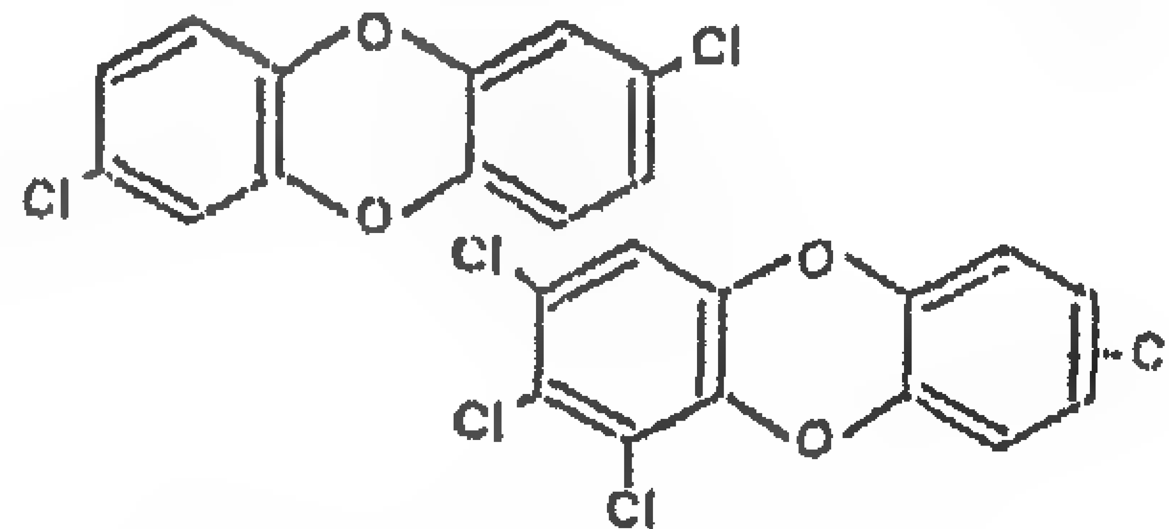
نظرة مستقبلية لطرق التحليل المناعى فى الدراسات البيئية

الاستكشاف البيئى وعلى الإنسان للكشف عن المركبات الخطرة بواسطة التحليل المناعى يعتبر من مجالات التحدى الجدية المبشرة والتى تستحق الجهد والعناء بما يساعد الوكالات التشريعية ومن يعمل فى البحوث الأساسية للتوكسيكولوجى فى تحقيق الأهداف الموضوعة . السؤال المطروح يظل كما هو عن كيف يقدم تحليل الأجسام المضادة وحيدة الكلونة Mab طريقة تحليل متكاملة تتساوى مع الطرق المتقدمة مثل GC/MS أو HPLC؟ التخصص العالى لأى طريقة تحليل مناعى تتعاكس مع الاستخدامات العامة لطريقة أو طرق الكروماتوجرافى . إذا كان الملوث غير معلوم أو فى حالة طلب الكشف عن ملوثات عديدة فى قليل من العينات تكون طرق الأجهزة الكروماتوجرافية مع مقياس الكتلة هى الأنسب . على العكس من ذلك إذا كان هناك عديد من العينات مطلوب تحليلها للكشف عن عدد محدود من المركبات تكون طريقة التحليل المناعى هى الأكثر ملائمة . مثال ذلك إذا كان باحث يقوم بالكشف عن التلوث بالتى سى دى دى فى عديد من عينات التربة ومن ثم يجرى تحليل تفصيلى بجهاز GC/MS على العينات الموجبة التلوث للكشف عن طبيعة التلوث . هذين الاتجاهين تسمح بالتحليل المناعى بجميع العينات من الحقل ثم يوجه طريقة الكروماتوجرافى للعينات مثار الاهتمام . باحث آخر قد يهتم ويأخذ فى الاعتبار نظم التهجين حيث تعمل الأجسام المضادة على تركيز العينة قبل التحليل أو حيث يجرى التحليل المناعى على بعض نواتج الفصل الكروماتوجرافى فقط .

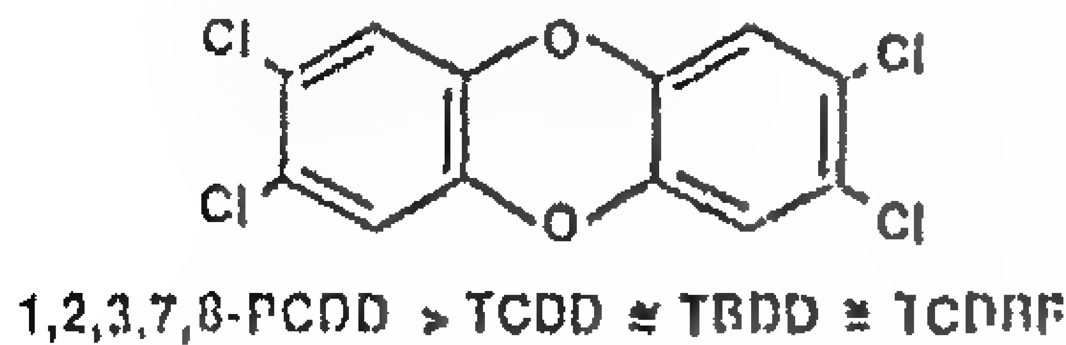
RECOGNIZED STRUCTURES RELATED TO THE IMMUNOGEN



NON-TOXIC CONGENERS RECOGNIZED



TOXIC CONGENERS RECOGNIZED



CONGENERS NOT RECOGNIZED

Unclorinated-DD	1,2,3,4-Tetra-CDD
Unchlorinated-DBF	1,2,3,6,7,8-Hexa-CDD
1-CDD	1,2,3,7,8,9-Hexa-CDD
1,2,4-Tri-CDD	Octa-CDD
ANY PCB	Octa-CDBF

شكل (٧-٥) : تخصص ارتباط Mab DD-3 الذى يمثل مجموعة الأجسام المضادة للديوكسين . الجسم المضاد يربط الديوكسينات ذات الارتباط مع هابتين المناعة مع تفضيل للرابط أو لأى مجموعة أمين فى الوضع 1# . الديوكسينات السامة المحتوية على مكونات إحلالية فى الأوضاع ٨,٧,٣,٢ يمكن تمييزها باختبار Mab . بعض الأقران قليلة السمية يمكن تمييزها كذلك مما يوضح وجود مجموعة كلورين واحدة على الأقل على كل حلقة ولا يوجد أكثر من خمسة ذرات كلورين كمجموع .

جدول (٧-١) : خصائص الأجسام المضادة وحيدة الكلونة التى تنتج بواسطة ٢٨ كولونات هيبريدوما . التركيزات المطلوبة لتثبيط ٥٠% (I50) للاليزا مدونة لمركبات ٨,٧,٣,٢ تتراكلورو دايبنزوديوكسين (TcDD) ، ١- أمينو ٨,٧,٣ ترايكلورودابنزو بوكسين (A-tri CDD) والهابتين المستخدم فى المناعة (الرابط DD) .

Mouse	Clone Number	I50 (ng) Linker-DD	A-TriCDD	TCDD
11-1a	61	5	10	>10
	71	>10	>10	>10
	74	>10	>10	>10
	75	>10	>10	>10
	96	>10	>10	>10
	102	0.3	0.3	>10
	108	5	5	>10
	110	1	0.6	>10
	DD-1	0.15	<.02	1
11-1b	47	0.6	0.03	>10
	DD-3	0.15	<.02	7
11-8	75	0.3	.07	>10
	DD-5	0.15	<.02	2.5
12-6a	42	7	2.5	>10
12-6b	52	0.6	0.3	>10
	DD-4	0.3	<.02	1
2-4	9	1	1	>10
	19	0.6	<.02	>10
	22	1	.3	>10
	23	0.6	0.6	>10
	24	0.6	<.02	>10
	26	0.6	<.02	>10
	32	1	0.7	>10
	DD-6	0.5	<.02	1
3-7	12	0.6	>20	>20
	14	>20	>20	>20
	24	>20	>20	>20
	25	1	>20	>20

بالنسبة للوكالات التشريعية والصحية فان استخدام طرق التحليل المناعى تقدم وسائل غير مكلفة للكشف عن مخلفات المبيدات والملوثات فى الغذاء والمواقع البيئية المختلفة كما يمكن أن تستخدم فى التقدير الكمي لتعرض المشتغلين . مثال ذلك استخدام الاليزا للكشف عن الباراكوات حيث توضع وحدات الكشف فى مرشحات الهواء وأماكن مخدات التعرض القماش والعينات الحيوية لتقدير تعرض العمال خلال الرش الجوى لزراعات القطن (المرجع ١) . حيث أن التحليل بتجهيزاته يمكن أن يحمل من مكان لآخر ونظرا لعدم احتياجه لأجهزة متقدمة فانه يمكن إجراء التحليل فى موقع التلوث مما يحقق الحصول على فترات وجود وحدوث التلوث . آلية التحليلات الحيوية تسمح بإجراء تجهيز متوازى للعينات مما يسمح بزيادة عدد العينات التى يمكن تحليلها فى الوقت المناسب . الأجسام المضادة وحيدة الكولونات تضيف الى هذه المميزات من خلال الجواهر الكشافة المعروفة وإمكانية اختبارات جودة ودقة التحليل . العديد من المعامل تستطيع إجراء التحليل الحيوى مع نفس الجواهر الكشافة القياسية لتحقيق مقارنات صحيحة وجيدة .

بالنسبة للعاملين فى البحوث تقدم تجارب التحليل المناعى وإمكانية فرص لإجراء تجارب لم تكن ممكنة من قبل . مع خفض اتجاهات التحليل الكيميائى فانه يمكن أخذ عينات غير محدودة للإجابة عن التساؤلات الخاصة بامتصاص وتمثيل والسلوك البيئى للمبيدات . مثال ذلك أن التخصص فى التحليل بالأجسام المضادة وحيدة الكلونة Mabs تسمح باختيار الأجسام المضادة التى تحقق التفاعل العبوري مع العديد من الممثلات أو تفرق فيما بينها . من احسن الأمثلة عن كفاءة التحليلات المناعية المبنية على Mabs فى البحوث تقدير قنوات العلاقة بين المسرطن وقنوات الحمض النووى "الدنا" Carcinogen – DNA adducts . الدراسات مع المواد الايثليلية تسمح بكمية الجرعة على مستوى الخلية الفردية باستخدام الطرق الكيميائية الهستولوجية . الاختلافات فى التوزيع الابتدائى وإصلاح ممرات وقنوات "الدنا" يمكن أن ترى بوضوح بين الأعضاء فى كل الحيوان وكذلك بين أنواع الخلايا فى نفس العضو (المرجع ١٦) . الدراسات التى استخدم فيها الأجسام المضادة للبنزو – الفا – فرين دنا ، ممرات الميثيل ديوكسى جوانوسين فى الإنسان تقدم الأسس الكيميائية لتقدير الجرعة فى الدراسات الوبائية (مرجعى ١٧ ، ١٨) . الدراسات المشابهة عن الامتصاص والتوزيع ومسك المبيدات فى الحشرات والنباتات والثدييات بما فيها الإنسان سوف تساهم فى الحصول على الأساسيات البحثية فى مجال السمية والسموم . فى هذه الدراسات تقدم Mabs طريقة حساسية ذات تخصص عالى .

REFERENCES

Albro, P.W., M.I. Luster, K.Chae, G. Clark and J.D. Mckinney, (1979). Toxicol Applied Pharmacol 50, 137-146.

Atassi, M.Z., C.J. Van Oss, and D.R. Absolom, (1984). Molecular Immunology: a Textbook, Marcel Dekker, New York.

Butt, W.R. (1984). Practical Immnoassay: The State of the Art., Marcel Dekker, New York.

Delaage, M., B. de Veyrac, A. Morel, M. Cailla, and J.L. Drocourt, (1984). In: Monoclonal Antibodies and New Trends in Immunoassays, p. 53-58, C.A. Bizollon, Ed., Elsevier, New York.

Goding, J.W., (1983). Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, New York.

Groopman, J.D., L.J. Trudel, P.R. Donahue, A. Marshak-Rothstein, and G.N. Wogan, (1984). Proc. Natl Acad Sci, USA 81, 7728-7731.

Hammock B.D. and R.O. Mumma, (1980). In: Recent Advances in Pesticide Analytical Methodology p. 321, J. Harvey Jr. and G. Zweig, Eds., American Chemical Society Symposium Series. Washington, D.C.

Menkveld, G.J., C.J. Van Der Laken, T. Hermsen, E. Kriek, E. Scherer, and L. Den Engilse, (1985). Carcinogenesis 6, 263-270.

Newsome W.H. and J.B. Shields, (1981). J. Agric. Food Chem. 29, 220-222.

Perera, F.P., R.M. Santella, and M.C. Poirier, (1985). In: Banbury Report 19: Risk Quantitation and Requlatory Policy, p. 211-229, D.G. Hoel, R.A. Merrill and F.P. Perera, Eds., Cold Spring Harbor Press, New York.

Rinder D.F. and J.R. Fleeker, (1981). Bull. Environ. Contam. Toxicol, 26, 375-380.

Van Emon, J.M., B. Hammock, and J.N. Seiber, (1986). Analytical Chmistry 58, 1866-1873.

Van Emon, J.M., J.N. Seiber, and B.D. Hammock, (1985). p. 307, In: Bioregulators for Pest Control, American Chemical Society Symposium Series #276, P.A. Hedin, Ed., Washington, D.C.

Wild, C.P., D. Umbenhauer, B. Chapot, and R. Montesano, (1986). J. Cellular Biochem, 30, 171-179.

Wing K.D. and B.D. Hammock, (1979). Experientia 35, 1619-1620.

جينات الدفاع النباتية Plant defense genes

النباتات مقاومة لغالبية الممرضات المؤثرة فى البيئة (المقاومة للنوع أو المقاومة لغير العائل) . هناك عدد محدود من الممرضات قادرة على تأخير أو منع الوسائل الدفاعية واستجابات الدفاع فى بعض الأنواع النباتية أو تحقق وتطور تقنيات التفاعلات الخاصة بالدفاعات النباتية المتخصصة . فى هذه الحالات يصبح النبات حساسا (الحساسية الأساسية أو الخاصة بالنوع) وكذلك ظهور علاقات بين العائل الحقيقى والممرض . الأصناف الخاصة من العوائل النباتية ذات مقاومة عالية للسلالات الخاصة من الممرض (مقاومة ضعيفة cultivar resistance) . التقنيات الجزيئية تتضمن المقاومة الصنفية وغير العوائلية تبدو متشابهة . بالإضافة الى تقديم الحواجز فان هذا النوع من المقاومة يتضمن مجموعة جديدة من تقنيات الدفاع النشيطة . النشاط الخاص باستنساخ جينات نباتية دفاعية متخصصة يبدو أنها تلعب دورا هاما فى تحقيق تحفيز هذه الاستجابة . هناك مطالب سابقة لتنشيط جينات الدفاع وهى تتمثل فى توجيه إشارات مناسبة بواسطة الخلية النباتية وخلية نسخ لاحقة للنواة . هذه الجينات تشفر مكونات هذه العمليات الأخيرة التى تمثل أقسام إضافية للجينات التى قد تشترك فى الدفاع الناجح للممرض من خلال تنظيم نشاط جينات الدفاع .

أقسام جينات الدفاع النباتية

هناك عدد من الجينات تشترك فى الدفاع ضد الممرضات النباتية وقد أمكن كلونتها من النباتات المختلفة . يمكن تقسيم هذه الجينات لعدة أقسام تبعا للوظيفة أو فى حالات غير معروف وظائفها تبعا للتركيب .

التمثيل العام للفينيل بروبانويد

تتابع التخليق الحيوى الذى يحول الفينيل الانين فى إسترات مرافق الثيول الانزيمى لأحماض الهيدروكسى سيناميك يعرف بعمومية تمثيل الفينيل بروبانويد . التفاعلات المحورة لهذا التمثيل تساعد وتحفز بثلاثة انزيمات هى الفينيل الانين أمونياليز ، سيناميك أسيد ٤- هيدروكسيليز ، ٤ كومارات : مرافق انزيم ليجيز والتى تنشط فى العديد من النباتات عند مهاجمة الممرض (مرجع ١) . الجينات التى تشفر الانزيم الأول والأخير فى هذا المسار تم عزلها وتحليلها فى العديد من النظم . لقد تمت كلونة الفينيل الانين أمونياليز من البقدونس (مرجع ٢) . والفول الفرنسى (٣) والبطاطس (٤) اما جينات ٤- كومارات : مرافق انزيم A ليجيز توجد فى البقدونس (٥) والبطاطس (٤،١) . لقد ثبت وجود اثنين فقط من جينات ٤ كومارات : coA ليجييز فى البقدونس والبطاطس (١) اما الفينيل الانين

أمونيا ليز شفرت بواسطة عائلات كثيرة من الجينات المتعددة ذات الأحجام المختلفة في النظم التي حللت بعد ذلك (٣،٢،١) .

المركبات ذات التمثيل العام للفينيل بروبانويد تعمل كمواد وسيطة للعديد من المسارات الفرعية لتخليق مشتقات الفينيل بروبانويد ذات التراكيب والوظائف المتنوعة مثل الفلافونيدات والأيزوفلافونيدات والكومارنيات والأستلبينويدز وغيرها من الفينولات الذائبة والمرتبطة على الجدر والبادئات لبلمرة السطح وتعضيد التراكيب مثل اللجنين والسوبيرين (١) . العديد من هذه المنتجات ذات صفات مضادة للميكروبات أو تكون حواجز طبيعية وتخلق إجباريا أو بمعدلات زائدة بمجرد مهاجمة الممرض (٦) .

الفيتو الكسينات

الفيتو الكسينات عبارة عن مركبات مضادة للميكروبات ذات أوزان جزيئية منخفضة تخلق بواسطة النباتات كجزء من الاستجابة المتعددة الدفاعية (٦) . الممثلات الثانوية تعمل كفيتو الكسينات في النباتات المختلفة وهي ذات تراكيب متنوعة . العديد منها وليس الكل تنشأ من المسار العام للفينيل بروبانويد (٦) القليل من الجينات فقط يشترك بشكل متخصص في تخليق الفيتو الكسينات وقد تم كلونتها بعد ذلك . كل هذه الجينات تشفر انزيمات مسارات الفينيل بروبانويد . في الفول الفرنسي تم وصف عائلة عديدة الجينات تشفر تخليق الكالكون (٧) وقد تم عزل cDNA الخاص بانزيم الكالكون أيزوميريز . كلا الانزيمين تشترك في خطوات تحويل أحماض هيدروكسي سيناميك المنشطة في الفيتوالكسين كيثيتون . الكولونات الجينومية و cDNA التي تشفر ريزفيراترول سينسيز تم عزلها من الفول السوداني (٩) . هذا الانزيم يحفز تكوين ريزفيراترول وهو فيتو الكسين الفول السوداني . في النهاية فان كولون cDNA نزرس – أدينوسيل –ل– ميثيونين : بيرجاتبول أ– ميثيل ترانسفيريز ثم عزله من البقدونس (١) . هذا الانزيم متخصص حيث يشترك في الخطوات الأخيرة التي تؤدى الى تخليق فورانوكومارين فيتو الكسينات .

مكونات جدار الخلية .

يعمل جدار الخلية النباتية كحاجز طبيعي ضد مهاجمة الممرض . ليكن معلوما أن كل الممرضات التي نجحت في اختراق سطح النبات بنشاط عندها وسائل تمكنها من تحطيم جدار الخلية . بالإضافة الى تكوين الكالوس الذي يرجع الى نشاط اللوستيريك لانزيم جلوكان سينسيز (١٠) وتغليف الجدار بالفينولات (٦) فان عدد من البروتينات تفرز بواسطة الخلايا بمعدلات زائدة وتصبح مرتبطة بجدار الخلية في صور مختلفة . جدر الخلايا النباتية تحتوى على البيروكسيديز أيزوانزيمات والتي تشترك في تكوين اللجنين والسوبيرين والربط

العبورى لمكونات جدر الخلايا (٦) . زيادة الأنشطة الانزيمية وجدت فى العديد من النباتات بمجرد مهاجمة الممرض أو المعاملة بالمحفزات (٦) . انزيم البيروكسيديز المشفر فيه cDNA تم عزله من القمح واستخدم لتقدير نشاط الاستنساخ فى الجين المقابل فى أوراق القمح المعدية والتى تحتوى فى نفس الوقت مستويات متزايدة من البيروكسيديز فى الفراغات بين الخلوية (١١) . فى المواضع الشمالية فان cDNA لبيروكسيديز القمح تهجن الى mRNA انتقالى ساكن يتراكم فى أوراق الشعير عند العدوى بالفطر رينكو سبوريوم سيكاليس (١٢) . زيادة كميات mRNA التى توجد إجباريا على جدار الخلية أدت الى الكشف عن تكوين السبرنة المرتبطة مع البيروكسيديز غير الأيونى مع cDNA من البطاطس فى خلايا الطماطم المزروعة بمجرد معاملة التحفيز (١٣) .

الجليكوبروتينات الذائبة الغنية بالهيدروكسى برولين مثل الاكتنسين تفرز بمعدلات متزايدة عند العدوى أو مع معاملات التحفيز للخلايا النباتية . يبدو أن البيروكسيديزس تساعد الارتباط العبورى لهذه الجلايكوبروتينات من خلال كبارى الأيزوداى تيروسين والتى تؤدى الى تكوين مكون جدار غير ذائب (٦) . لقد وجدت ثلاثة جينات تشفر الجليكوبروتينات الغنية بالهيدروكسى برولين يحدث لها تنظيم مختلف فى الفول الفرنسى عند الجرح أو العدوى (١٤) . الجينات التى تشفر بروتينات الجدار الخلوى الغنية بالجلايسين تم الكشف عن تنشيطها عند العدوى بالفيروس أو المعاملة بجامعة ساليسيلك الدخان (١٥) . الثيونين أحد أقسام البروتينات السامة التى تتراكم بكميات كبيرة فى جدر الخلية وفجوات أوراق الشعير المعدية . فى هذا النبات يتم تشفير الثيونين بواسطة عائلة متعددة الجينات معقدة تتكون من ٥٠ – ١٠٠ فرد فى كل جينوم haploid genome .

انزيمات اللتيك Lytic enzymes

يوجد عدد من النباتات تستجيب للعدوى او الحاملة بالمحفزات أو الايثيلين مع زيادة معدلات تخليق انزيمات تتراكم فى الفجوات وفى الفراغات بين الخلوية لأنسجة النبات المعامل . كلا الانزيمين يملكا نشاط تحليل داخلى للجلوكوز ومن ثم تستطيع تحليل وانهيار مكونات خاصة للعديد من جدر الخلايا الفطرية والبكتيرية . لقد تمت كلونة انزيمات أو جينات الكيتيز بسبب الاستجابة للممرض و/أو المحفز من نباتات الدخان (٢٣) والبطاطس (٢٤) . اتضح ان كل هذه الجينات تنتمى الى عائلات متعددة الجينات مع تنظيم معقد بواسطة منشطات مختلفة مثل هجوم الممرض وحدوث الجروح أو المعاملة بالهورمونات .

البروتينات المرتبطة بالمرضية

البروتينات المرتبطة بالمرضية (PR) اكتشف أنها تتراكم فى نباتات الدخان خلال الاستجابة المناعية لفيروس موزيك الدخان (٢٥) . منذ ذلك الحين وجدت بروتينات مماثلة أو متطابقة فى العديد من النباتات المختلفة المعدية بالفيروسات أو الفيرويدز أو البكتريا والفطريات وبعد المعاملة بالمحفزات أو الكيميائيات (٢٥) . فى الأصل تم وصف بروتينات المرضية PR على أنها بروتينات قليلة الوزن الجزيئى تقاوم البروتييز مع مواضع حامضية أيزوكهربية تتراكم دائما فى الفراغات بين الخلوية للأوراق المعدية (٢٥) . مع استثناءات قليلة تم تعريض بروتينات المرضية PR كانزيمات جلوكونيسيز أو كيتنسيز (١٩) ولكن وظيفة هذه البروتينات مازالت غير معروفة .

لقد وجد أن سبعة أقسام من كولونات cDNA تشفر بروتينات المرضية حيث تم عزلها من الدخان اثنان منها تمثل جينات الكيتنيز وواحد يشفر البروتين المشابه للثوماتين . كل هذه الجينات تحدث فى عائلات متعددة الجينات صغيرة . لقد أعتقد أن بروتينات المرضية فى الدخان تلعب دورا فى إحداث المناعة المكتسبة . لقد تم وصف جينات تشفر قيم آخر من بروتينات المرضية ذات تركيب مختلف فى البقدونس والبطاطس والفول الفرنسى والبسلة . تخليق البروتينات ذات السلاسل المتجانسة يحفز وسطيا عند العدوى أو المعاملة بالمحفزات ولكن وظيفتها مازالت غير معلومة . بالإضافة الى ذلك فان بروتينات المرضية هذه أوضحت تتابع قوى متشابه لما يحدث مع المادة المحدثة للحساسية من حبوب لقاح شجر القضبان (بيرش) . تضاعف أو تكوين نسخ متشابهة جدا للجين الذى يشفر نوع آخر من بروتين المرضية أظهر تتابع محكوم أو متشابه لبروتين صدمة الحرارة 26-KDA من فول الصويا وقد وجد فى البطاطس . بالرغم من أن بادىء ومنشط هذا الجين يحتوى على عناصر شبيهة لصدمة الحرارة فانه لم يتم الكشف عن نشاط جينى عند حدوث صدمة بالحرارة .

حديثا تم عزل عدد من كولونات cDNA والجينومية من البقدونس تمثل جينات الوظائف غير المعروفة والتى تنشط سريعا وانتقاليا بمجرد معاملة التحفيز (٣٥) . لا يوجد تجانس معنوى داخل هذه المجموعة من الجينات . من اكثر الأمور إثارة أن ١٦ من هذه الكولونات cDNA عبرت كحزم تهجينية فى جينوم ساوثرن مع الحمض النووى DNA من Arabidopsis والبرسيم الحجازى والبطاطس مما يوضح أنها تم الحفاظ عليها خلال التطور بين الأنواع النباتية المختلفة (٣٦) . حيث أن معظم هذه الجينات بالإضافة الى أنها تنشط سريعا بالمعاملة بالمحفز الخاص بخلايا الأرابيدوبسيز المزروعة فأنها أيضا حوفظ

عليها بسبب عدم المعرفة بوظائفها فى تحقيق الدفاعية فى النباتات . سبحانك يا قادر ياعظيم النافع والضار فى نفس النبات ومن يدرى ما سيسفر عنه المستقبل .

تنظيم جينات الدفاع فى النباتات Regulation of plant defence genes

فى العديد من النباتات فان الكشف عن الاستجابات السريعة لهجوم المسبب المرضى تتضمن النكرزة الموضعية أو تراكم الكالالس أو الفلورسنس الذاتى للخلايا أو جدر الخلايـا والتى ربما ترجع الى الفينولات (٦) . ليس من المعروف بعد إذا كـان النشـاط الجينـى يشترك كليا فى هذه الاستجابات المبكرة . التنشيط السريع لجينات الدفاع النباتية المختلفـة لوحظت فى مساحة صغيرة من النسيج التى تحيط بمركز العـدوى (٣٧) بينمـا الجينـات المشفرة للجلوكانيسيز والكيتنيريز ظهرت من جراء التنشيط بشكل جهازى فـى المراحـل المتأخرة من العدوى (٣٨) . فى العديد من النباتات فان نسخ معظم هذه الجينات يتم تحفيزه من معاملة الخلايا المزروعة مع محفزات مناسبة (٣٩) . لقد أستخدم عدد من هذه الأنظمـة بنجاح لدراسة تقنيات تمييز المحفز وإشارات الاستنساخ وتنشيط جين المناعة .

تمييز المحفز Elicitor recognition

العديد من التراكيب المختلفة للميكروبات والسطوح النباتية التى تنفرد خلال عمليـة العدوى يمكن تمييزها بواسطة الخلايا النباتية كإشارات لهجوم الممرض (٤٠) . المحفـزات المنقاة لتنشيط جينات الدفاع النباتية تشمل الكربوهيدرات والبروتينـات والجليكوبروتينـات ومشتقات الأحماض الدهنية (٤٠) . بالرغم من أنه فى العديد من الحالات غـير معـروف كيفية إحداث الفعل لهذه المحفزات فان النتائج التى تحصل عليها من النظم الثلاثة أوضحـت وجود مواقع ارتباط متخصصة على السطح النباتى والتى بمجرد حدوث الارتباط بالمـادة تبدأ عملية سلسلة إشارات الاستنساخ والتى تؤدى الى تنشيط جينات المناعة النباتية . شرائح الجلوكان التى تنفرد من جدار خلية الممرض الفطرى لفول الصويا فيتوفثورا ميجاسبيرمافى النوع جلايسينيا تم تمييزها كمحفزات فيتوالكسين فى فول الصويا (٤١) . السهبتاجلوكان ذو التركيب المعروف هو أصغر بيتا – جلوكان ذات نشاط تحفيزى (٤٢) . تجهيزات الأغشية من جذور فول الصويا والفلقات والخلايا المزروعة تحتوى على مراكز مشـبعة للارتبـاط العكسى لتراكيب المحفز – بيتا جلوكان (٤٣ ، ٤٤) . مركز الارتباط عبارة عن موقع ذات طبيعة نشطة سطحيا مذابة من تجهيزات ميكروسومات جذور فول الصويا (٤٥) . لقد وجد علاقة موجبة قوية بين قابلية شرائح الجلوكان المختلفة لمواقع الارتباط ونشاطها التحفيزى .

الخلايا المزروعة وبروتوبلاست البقدونس تميز الجليكوبروتين ٤٢- Kda خـارج الخلية من نفس الفطر كمحفز لتكوين الفيتوالكسين (٤٦) . هذه المادة لـم يمكـن تمييزهـا

بواسطة خلايا فول الصويا (٤٧) وكذلك لم تتنافس على ارتباط البيتا – جلوكان على أغشية فول الصويا (٤٨) . محفز البيتا – جلوكان من جهة أخرى غير نشيط فى البقدونس (٤٧). أظهرت النتائج الأولية من تجارب الارتباط مع محفز الجليكوبروتين المعلم إشعاعيا والنشط وشرائح أو مكونات الميكروسوم وبروتوبلاست البقدونس وجود مواقع ارتباط متخصصة على غشاء البلازما (٤٩) . لقد استخدم نفس الطرق التجريبية للكشف عن مواقع الارتباط لمحفز الببتيدوجليكان من جدر الانبوبة الجرثومية للفطر باكسينيا جرامينيس من النوع ترتيباى على أوعية أغشية القمح (٥٠) . لقد كان الارتباط تشبعي وعكسي واتضح أن عدد مواقع الارتباط كانت أكثر على غشاء البلازما عنه على الأغشية الداخلية .

لقد أدت النتائج الى الاقتراح بأنه يوجد مواقع ارتباط متخصصة على سطح الخلايا النباتية لتمييز المحفزات تركيبيا . من المحتمل وجود سبل اخرى للتمييز غير الذاتي والتي يجب تعريفها فى النباتات إن كانت موجودة .

انتقال ونسخ الإشارات Signal transduction

الاستجابات الأولى التى يمكن الكشف عنها بعد معاملة خلايا البقدونس بالمحفز تتمثل فى تيارات الأيونات عبر غشاء البلازما (٤٩) . خلال دقيقتان وحتى أربع دقائق من انطلاق أو إضافة المحفز فان تيارات أيونات الايدروجين H^+ والكالسيوم Ca^{2+} وخروج تيارات البوتاسيوم K^+ والكلورين `٢٤ تبدأ فى الزيادة وتظل ثانية حتى ٣ – ٤ ساعات (٤٩) . أظهرت النتائج الأولية فى تجارب الحزمة – التثبيت Patch – clamp مع البروتوبلاست الطازج المجهز من البقدونس أنه يحدث زيادة فى نشاط قناة الأيونات بمجرد إضافة المحفز النقى من الجليكوبروتين (٤٩) . إن إزالة أيون الكالسيوم Ca^{2+} من وسط خلايا البقدونس المعاملة بالمحفز أو البروتوبلاست سوف تخفض كلا تراكم الفيتو الكسينات ورفع معدلات نسخ الجينات الخاصة بالاستجابة للمحفز . انطلاق أيونات الكالسيوم يبدو أنها تشترك أيضا فى الاستجابات الدفاعية فى أماكن تواجد المحفز فى فول الصويا والجزر والبطاطس . فى فول الصويا والجزر فان الاستجابة للمحفز تحاكي بواسطة أيونية الكالسيوم. و A22187 أما فى البقدونس فإن التيارات المتتابعة من الكالسيوم والكلورين والبوتاسيوم تتطلب الحدوث فى البقدونس عند كثافات معينة ومميزة . أظهرت معاملة خلايا فول الصويا والبقدونس بالمحفز المعلم إشعاعيا على الفوسفات حدوث تغيرات انتقالية فى نظام البروتينات المفسفرة (٥٤ ، ٥٥) . فى البقدونس كان عملية الفسفرة هذه تعتمد على الكالسيوم الخارجى وتتطابق جيدا خلال الوقت ما بين حدوث تيارات الأيونات وتنشيط جينات الدفاع .

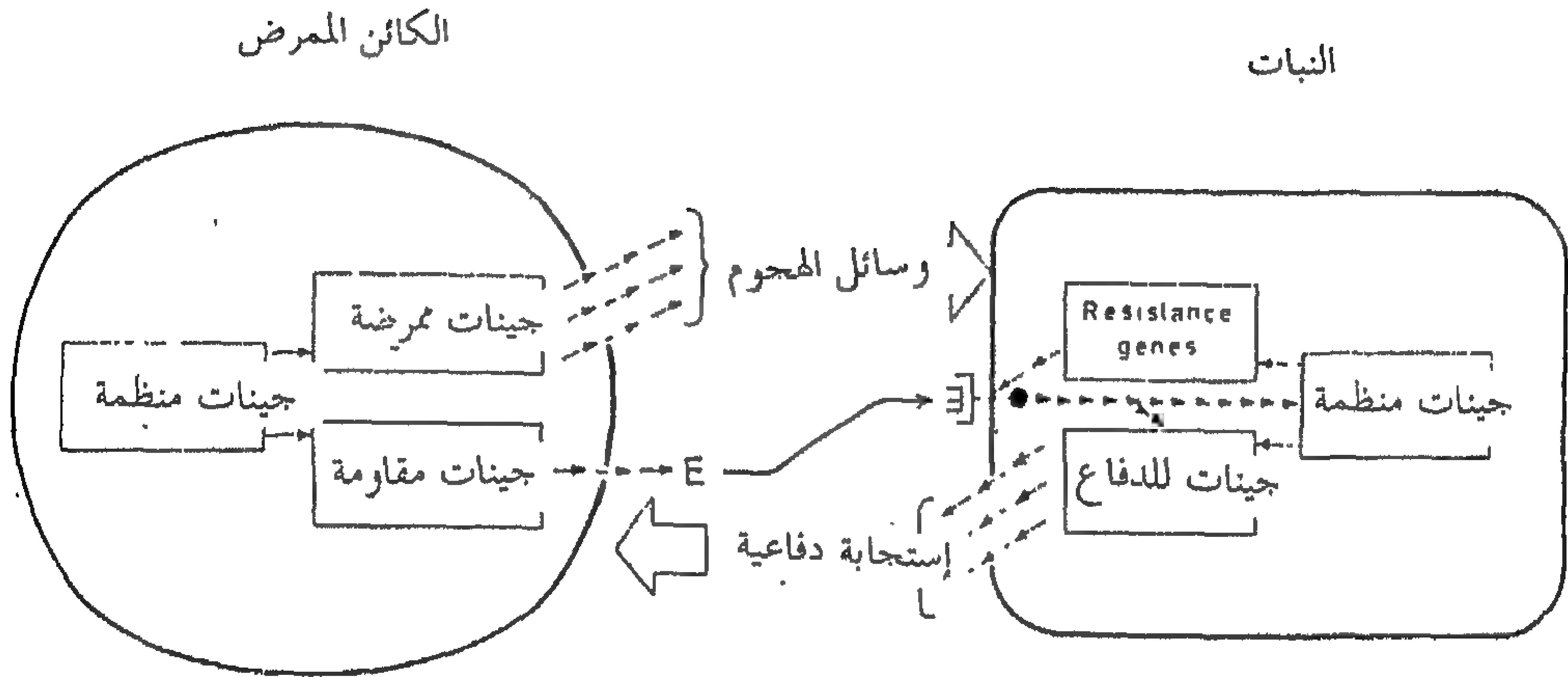
التحليل المحفز أو الترقى لجينات الدفاع النباتية Promotor analysis

الخطوة الأخيرة فى نسخ إشارة التحفيز لأى محفز هو تنشيط استنساخ جينات الدفاع النباتية . لذلك فان المنشطات لقليل من جينات الدفاع تم تحليلها للبحث عن وجود عناصر تنظيمية خاصة وليس عوامل نسخ حيث لم يعرف أى من الأخيرة . لقد تم تعريف ثلاثة عناصر تربط ما بين المحفز والاستجابة فى تنشيط جين (١) لانزيم الفينيل الانين أمونيليسيز فى البقدونس من خلال الطبع القدمى foot printing (٢) . التتابعات مع التجانس المحكوم توجد عند نفس المواقع فى تنشيط الجينات التى تشفر انزيمات الفينيل بروبانويد وكذلك الجينات الأخرى المسئولة عن الاجهاد والاستجابة . المنشط الذى ينظم المحفز العناصر المسكنة تم تعريفها فى منشط جين الكالكون سينسيز فى الفول الفرنسى من خلال التعبير الانتقالى فى نظام المحفز – الاستجابة فى نظام بروتوبلاست فول الصويا (٥٦) . من المثير أن منطقة التنشيط تحتوى على شريحة من التتابعات المتجانسة لواحد من العناصر الفعالة فى منشط الفينيل الانين أمونيا ليز فى البقدونس (٢) . هذا العنصر الذى لا يرتبط بهذه التتابعات ضرورى وكافى لتنظيم العلاقة بين الاستجابة والمحفز للجين الذى يشفر بروتين المرضية (٢) PR فى البقدونس والذى ينشط تحت ظروف متماثلة لتلك المطلوبة لتحفيز انزيم الفينيل الانين أمونيا – ليينز . الدخان التى تشفر بروتين المرضية PR La والبروتين الغنى بالجلايسين . بالرغم من أن نفس العنصر فى الجين يحدث الاستجابة للعدوى بالفيروس والمعاملة بحامض ساليسيليك . هذه التتابعات ليست مشابهة لأية من العناصر الفاعلة لجينات دفاعية لنباتات أخرى كما أنها لا تشابه إحدها الأخرى . فى النهاية خلص الكاتب الى ضرورة اجراء تحليل متقدم لتوصيف العناصر الفاعلة وظيفيا وكذلك العوامل الفاعلة الانتقالية لجينات الدفاع النباتية والتى قد تمثل ارتباط نهائى فى سلال النسخ المرتبطة بالإشارات .

الاستنتاجات Conclusions

يحدث تنشيط لمجموعة جديدة من جينات الدفاع النباتية بمجرد مهاجمة الممرض كجزء من استجابة دفاعية معقدة من قبل النبات . هذه العملية تتطلب توليد إشارات مناسبة فى منظومة العدوى وتمييزها بواسطة الخلايا النباتية . مواقع الارتباط والمستقبل قد تشفر بواسطة جينات المقاومة حيث يبدو أنها توجد على غشاء البلازما النباتية على الأقل مع بعض من هذه المحفزات . العلاقة بين الممرض والتحفيز قد تنشأ بشكل مباشر أو غير مباشر من جينات عدم العنف فى الممرض بينما المحفزات الداخلية قد تنفرد من جدار الخلية النباتية من خلال فعل نواتج جين المرضية . لقد تم وضع تصور لنموذج بسيط عن

الفرضية بين الممرض والنبات (شكل ٧-٦) . لكى يمكن تحسين مقاومة النباتات لمسببات الأمراض فان أى من هذه العمليات قد يكون هو الهدف المنشود . مع هذا فانـــــه مطلـــوب تفصيلات أكثر ومعلوماتية تفصيلية عن العديد من نظم المرضية لوضع أسس صلبة تمكـــن من الاتجاه نحو التحسين النباتى .



شكل (٧-٦) : نموذج افتراضى للإشارات الخاصة بالتداخلات بين النبات والممرض

REFERENCES

Boller, T., (1988). Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology 5, 145-174.

Cramer, C.L., K. Edwards, M. Dron, X. Liang, S.L. Dildine, C.P. Bolwell, R.A. Dixon, C.J. Lamb, and W. Schuch (1989). Plant Mol. 12, 367-383.

Darvill, A.G., P. Albersheim, (1984). Annu. Rev. Plant Physiol., 35, 243-275.

Douglas, C., H. Hoffmann, W. Schulz, K. Hahlbrock, (1987). J. 6, 1189-1195.

Hahlbrock, K., D. Scheel, (1989). Annu, Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40, 347-369.

Hedrick, S.A., J.N. Bell, T. Boller, C.J. Loamb, (1988). Plant Physiol, 86, 182-186.

Hofft van Huijsduinen, R.A.M., L.C. van Loon. (1986). J. F. Bol. EMBO J. 5, 2057-2061.

Kauss, H., T. Waldmann, W. Jeblick, C. Euler, R. Ranjewa, A. Domard (1989). in B.J. Lugtenberg (Ed.). Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions, Springer-Verlag, Berlin, p. 107.

Parker, J.E., W. Schulte, K. Hahlbrock, D. Scheel. (1990). Mol. Plant-Microbe Interact. in press.

Sharp, J.K., M. McNeil, P. Albersheim (1984). J. Biol. Chem. 259, 11321-11336.

Van den Bulcke, M., G. Bauw, C. Castresana, M. Van Montagu. (1989). J. Vandekerckhove. Proc. Natl. Acad. Sci. USA86, 2673-2676.

أرجو المعذرة من القارىء الكريم على تناول بعض الموضوعات حتى ١٩٩٠ لأننى أعتقد أنها أساسية وتوضح كثير من المفاهيم والاقترابات التى تجرى الأن بعد عشرة سنوات. لقد حضرت مناقشات هذه الموضوعات فى المؤتمرات الدولية خاصة مؤتمر الاتحاد الدولى للكيميائيات الزراعية النقية IUPAC على كل حال فان هذه المقالة مأخوذة من دكتور Dierk Scheel وعنوانه هو :

Max-Planck – institut fur Zuchtungsforschung , Abteilung Biochemie Carl – von- Linne-Weg 10 , D-5000 koln 30 , FRG .

تحمل مبيدات الحشائش والإسهامات فى الإدارة المتكاملة للمحصول

هذه المقالة للباحث الدكتور Hubert Mullner وعنوانه هو :

Division of Agriculture , Biological Research , Hoechst AG, D-6230 Frankfurt am Main 80 .

بسبب الأهمية المتزايدة للأمور البيئية فى المجالات الزراعية قامت شركة هوكست بتكثيف الجهود نحو إيجاد طرق ووسائل جديدة لحماية المزروعات . بداية نقول ان الحاجة للكيميائيات سوف تستمر لتحقيق إنتاجية محصولية عالية . مع ذلك هناك حاجة عاجلة وملحة للكيميائيات ذات الكفاءة العالية دون سمية على الإنسان سريعة التحلل والانهيار بدون أية تأثيرات ضارة على البيئة . بالإضافة الى الاتجاه نحو إيجاد كيميائيات نظيفة فان هناك اهتمام نحو استخدام الطرق والوسائل التى تحقق الإدارة المتكاملة للمشروعات أو إدارة السيطرة المتكاملة على الآفات والتى سوف تؤدى الى نقص شامل فى استخدام الكيميائيات فى الزراعة .

الإدارة المتكاملة للمحصول Integrated crop management

يظل السؤال مطروحا ما هى الخلفية وراء اتجاه الإدارة المتكاملة للمحصول ؟ لقد بدأت الفكرة بكيفية واتجاه النباتات والتقاوى المناسبة . يجب أن تتكيف الأصناف بما يلائم المنطقة كما يجب ان تحمل جينات المقاومة ضد الأمراض الكبرى . يجب تعريف المنطقة جيدا وكذلك المحاصيل التى تكيفت للأراضى والظروف المناخية السائدة هى التى تزرع فقط . الطرق التى استخدمت تحت مظلة الإدارة المتكاملة للمحصول تشمل العزيق والزراعة والحصاد والتى يجب أن تحور بما يمنع تكتل وتآكل التربة . الدورة المحصولية بما فيها اختيار النباتات التى تحمل مع النباتات الأصلية يمكن أن تساعد فى تقليل الأمراض ومن ثم تقلل من استخدام الكيميائيات . إعتمادا على نوع المحصول والتربة والتسميد العضوى أو غير العضوى يجب أن يستخدم بعناية فائقة أخيرا وليس أخرا لحماية النباتات

وعلى الفلاح ألا يعتمد على الكيماويات فقط ولكن عليه أن يستخدم الطرق البديلة . هذه تشمل الوسائل غير المباشرة مثل المحاصيل المقاومة بالإضافة الى الوسائل الطبيعية والكيميائية والبيوكيميائية . بوجه عام وشامل فان الإدارة المتكاملة للمحصول لم تستكمل أبعادها ووسائلها بعد ولكنها مفهوم يعتمد بالتساوى على الأهداف الاقتصادية والبيئية . الهدف العقلانى لا يتمثل فى تحقيق إنتاجية قصوى ولكن إنتاج أمثل ومناسب . الطرق القديمة الصماء يجب أن تستبدل بوسائل متزنة ذات كفاءة . التربية النباتية هى المفتاح فى هذا المفهوم لأن العديد من مشاكل الإدارة المتكاملة للمحصول يمكن حلها بتطوير وتحسين النباتات المثلى .

تربية النباتات كعامل متحكم فى الإدارة المتكاملة للمحصول والآفات

منذ بداية تربية النباتات لم تتغير الأهداف الكبرى . لذلك فان تحقيق الزيادة المحصولية مازالت الهدف الرئيسى الهام بل أهم الأهداف جميعا . الآن أصبح الحصول على نباتات مقاومة للأمراض وتحسين الجودة فى المنتجات النباتية على قدم المساواة فى الأهمية والأهداف . فى البداية استخدمت سبل الانتخاب والتهجين العبورى كوسائل لتحسين النباتات . التربية الكلاسيكية أو التقليدية وجدت وحسنت كما فى إنتاج بذور الشلجم بدون جلوكوسينولات أو حمض الايروسيك ولهذا أصبح هذا الزيت يستخدم الآن على نطاق واسع فى التغذية . الآن تمكنت الطرق الحديثة وتقنيات بيولوجيا الخلية فى إحداث تغيرات أولية كبرى فى التربية النباتية . لقد أصبح فى الإمكان تجزىء النسيج النباتى فى خلايا فردية حتى بدون جدار خلوى محدد . لقد أصبح فى الإمكان انتخاب الصفات النباتية الجديدة على مستوى الخلايا الفردية والكالاس . النسيج النباتى المنتخب يمكن إعادة تخليقه الى نباتات خصبة . بالإضافة الى التقدم المذهل فى بيولوجيا الخلية وأن البيولوجيا الجزيئية لاقت اهتماما متزايدا لمربى وتربية النباتات . الآن أصبح فى الإمكان نقل الحمض النووى DNA الغريب فى الخلايا النباتية كى تتكامل المعلومات بشكل ثابت فى جينوم النبات والحصول على هجن من النباتات المتحولة التى تحمل الصفات الجديدة المرغوبة . لقد أدت الاستفادة من تقنيات بيولوجيا الخلية والبيولوجيا الجزيئية الى وجود وتعظيم دور مجالات جديدة فى تربية النباتات وفى تكنولوجيا الجين فى النباتات .

تكنولوجيا الجين فى النباتات Gene technology

المشاكل التى لم يمكن حلها بشكل مرضى بواسطة مربى النباتات حتى الآن مثل المقاومة ضد الأمراض الفيروسية والفطرية أصبحت قريبة التناول بشكل فعال مع تكنولوجيا الجين . التقنيات الفعالة قد تؤخذ ويستدل عليها من كل كائن حى فى الغالب .

المقاومة للحشرات فى النباتات غير المحصولية ترجع فى الغالب الى تعبير مجموعة من المركبات والتى عادة ما تكون سامة . مع مساعدة تكنولوجيا الجين أصبح فى الإمكان حاليا التعبير عن التوكسينات فى النباتات والتى تكون ذات تخصص عالى مع الآفات الحشرية والتى لا تظهر أية تأثيرات توكسيكولوجية على النباتات والإنسان . هناك استخدامات أخرى لتكنولوجيا الجين مع النباتات مثل التحمل ضد مبيدات الحشائش وضد الحرارة والاجهاد من البرد والجفاف وكذلك تكييف النباتات فى الأراضى الملحية وهندسة منتجات التخزين النباتية مثل الزيوت والبروتينات والكربوهيدرات . تضطلع شركة هوكست الآن ببرنامج فى تربية النباتات ولكن منذ عشر سنوات كانت الشركة مهتمة جدا باستخدامات البيولوجيا الجزيئية فى مجالات متعددة . لذلك قامت شركة هوكست منذ سنوات قليلة فقط فى تعضيد البحث العلمى فى مجال تكنولوجيا الجين فى النباتات .

إن تحقيق تحمل النباتات ضد مبيدات الحشائش ومسببات الأمراض النباتية وكذلك الحشرات تعتبر من الأهداف العامة ولكن المقاومة ضد مبيدات الحشائش تعتبر من أكثر الموضوعات والمجالات أهمية بالنسبة للشركة . السبب فى هذا الاهتمام والأولوية يمكن شرحه بسهولة . بالإضافة الى اشتراك الشركة فى برامج ومجالات الحصول على مبيدات حشرية وفطرية جديدة فأنها تحتل وتحقق جزء كبير من سوق مبيعات مبيدات الحشائش مثال ذلك الجيل الجديد من مبيدات الحشائش الذى تحقق بالحصول على مبيد الحشائش غير المتخصص الجليفوسات . ليست كل مبيدات الحشائش مناسبة لتحقيق التحمل النباتى من خلال تكنولوجيا الجين . التحمل لمبيدات الحشائش فقط مقبول عقلانيا إذا كان المبيد المستهدف ذات ميزات عن المبيدات الأخرى فى الاستخدام المتخصص الاختيارى كما فى اعتبارات خاصة بالصفات والنواحى الايكولوجية . إذا كان هناك مركب يحقق معايير انخفاض السمية على الإنسان والانهيار السريع وتحقيق الفاعلية العالية ولكنه غير اختيارى فان التوسع فى استخدام هذا المركب من خلال إيجاد نباتات تتحمل هذه المبيد يكون مطلوبا.

تحمل مبيد الحشائش فى النباتات Herbicide tolerance

الكلام الذى يحبذ التوسع فى استخدام وتطوير نباتات تتحمل مبيد الحشائش هى إمكانية تحقيق فوائد للفلاح والبيئة . فى الأول وفى معظم الحالات فان الفلاح قد يتوقف عن استخدام مبيدات الحشائش قبل الانبثاق preemergent بسبب توفر مركب عالى الكفاءة سريع الانهيار حيث لا يمكنه الانتظار حتى يصل لمرحلة حدوث حد الضرر . لذلك فانه باستقلالية عن توصيات التطبيق يستخدم مبيد الحشائش . هذا النظام مثير للاهتمام فى حالة الحشائش التى ترتبط عن قرب بالمحاصيل مثل الخردل مع بذور الشلجم أو الارز الأحمر فى الأرز والتى لا تكافح بكفاءة بالمبيدات الاختيارية . إذا كانت هناك محاصيل عديدة

تتحمل مبيد الحشائش فان هناك فائدة أخرى يمكن تحقيقها وهى تبسيط مكافحة الحشائش لأنه يمكن استخدام مبيد واحد فى محاصيل مختلفة . النظرة الشاملة تقول بحدوث خفض عام فى كمية المبيدات الكيميائية التى استخدم بسبب إحلال مبيدات ما قبل الانبثاق بمعاملات بعد الانبثاق . بالإضافة الى ذلك فانه عندما يتم إحلال مركبات موصفة جيدا بجزيئات أخرى ذات فعل مختلف وسمية وثبات مختلف فان التأثيرات البيئية الضارة تقل بشكل معنوى . لذلك فان تطوير نباتات تتحمل مبيد الحشائش يمكن أن تعضد بشكل قوى فكرة واقتراب الإدارة المتكاملة للمحصول .

التحمل لمبيد الباستا Basta ® – Tolerance

الحمض الأمينى جلوفوسينات أو ما يسمى فوسفينوتريسين يعتبر جزء من الببتيدات الثلاثية الطبيعية والذى ينتج بواسطة الكائنات الدقيقة فى التربة . المركب مبيد حشائش غير اختيارى (متخصص) non-Selective ذات طريقة فعل معروفة كما أنه سريع التحلل فى التربة . الجلوفوسينات ذات سمية منخفضة جدا على الإنسان وهو يستخدم فعلا لمكافحة الحشائش فى مزارع العنب وبساتين الفاكهة . لقد قدمت شركة هوكست مركب الجلوفوسينات كمبيد حشائش غير اختيارى . بعد ان أستقر المركب وحقق كل المتطلبات قررت شركة هوكست تطوير النباتات ذات التحمل للجلوفوسينات . لقد أدت الابحاث المبكرة الى معرفة أن الجلوفوسينات يعمل من خلال تثبيط انزيم جلوتامين سنسينتيز فى النباتات . هذا هو الانزيم المحدد والمفتاح فى فقد سمية الأمونيا التى تنتج خلال التنفس الضوئى وتمثيل الحمض الأمينى وخفض النترات . إذا تحقق إيقاف عمل ونشاط انزيم الجلوتامين سينسيتيز فان مستوى الأمونيا يزداد ومن ثم يسبب قتل النبات (سبحانك ياقادر يا عظيم ... النافع والضار معا ... الكل في نظام محكوم) .

بناء على هذه المعلومات كان هناك أربعة مسارات تمكن من الحصول على نباتات مقاومة لفعل الجلوفوسينات :

١-الانتخاب فى خارج الخلايا .
٢-التعبير الفائق عن الانزيم المستهدف .
٣-تحطيم وفقد سمية أو تنشيط مبيد الحشائش .
٤-بواسطة إحداث طفرية فى الهدف .

لقد قامت شركة هوكست باختبار إمكانية كل هذه المسارات الأربعة وكان أفضل الاتجاهات هو فقد سمية مبيد الحشائش . لقد أدى التعاون مع البروفيسور Fuhler ومجموعته البحثية Bielefeld الى عزل جين من Streptomyces

viridochronogenes يشفر لتحقيق نقل متخصص للأسيتيل Specific acetyltraorferase هذا الانزيم مسئول عن أستلة الجلوفوسينات وينتمي الى جينات التخليق الحيوى للـ bialaphos وهو الببتيد الثلاثي الطبيعي والذى أشتق منه الجلوفوسينات . هذه الأسئلة تمثل تقنية حماية ذاتية لأن المنتج الذى حدث له أستلة لايستطيع تثبيط الجلوتامين سينسيتيز باى شكل كان . لقد استخدمت نفس التقنية للحصول على نباتات تتحمل فعل وتأثيرات مبيد الحشائش . بعد استقرار تكتيك التتابع النيوكلوتيدى تمت ملائمة ونمذجة استخدام الكودون للتعبير النباتي ومن ثم تم إيجاد ناقل للتعبير جديد . فى البداية تم تحويل وهندسة نبات الدخان كنموذج . بعد التحول والانتخاب على الكاناميسين والجلوفوسينات أمكن الحصول على النباتات التى تنمو على بيئة تحتوى على ٥×١٠⁻⁴ مولر من الجلوفوسينات .

أظهر اختبار بقع نورثرن للحامض النووى DNA لهذه النباتات وجود الأسيتايل ترانسفيريز m-RNA فى كل النباتات المهندسة وراثيا وليست موجودة فى النباتات البرية الأصلية . من خلال تحليل ويسترن للنباتات المهندسة وراثيا باستخدام الأجسام المضادة التى تكونت ضد الأسيتايل ترانسفيريز المنقى أمكن تحقيق ترجمة m-RNA فى البروتين . أظهرت دراسات الحركية على النشاط الانزيمى الوسيط النشط إشعاعيا للجلوفوسينات والذى يسمى علميا L-phosphinotricin يحدث له أستلة كاملة بعد وقت قصير من التحضين مع مستخلصات النباتات المتحولة بينما كانت مستخلصات النباتات المقارنة بدون أى نشاط انزيمى ..نباتات الدخان المحتوية على هذا الانزيم تقاوم وتتحمل وتعيش مع استخدام ٢٥ لتر من الجلوفوسينات لكل هكتار . هذه الكمية تقابل مرات عديدة من كمية المبيد الكافية لتحقيق مكافحة فى الحشائش العادية .

باستخدام الأجروباكتيريا كناقلات أصبح فى الإمكان هندسة العديد من نباتات ذات الفلقتين . لذلك أمكن تحقيق الهندسة الوراثية فى كل من البرسيم الحجازى والطماطم والبطيخ والجذر وبذور الشلجم بحيث أصبحت صفة التحمل لمبيد الحشائش جلوفوسينات . حيث أن النباتات وحيدة الفلقة أقل حساسية للعدوى بالأجروباكتيريا لذلك فان القليل من الأنواع هى التى حدث فيها تحول وراثى مثل الاسبرجس . بسبب أن الحبوب هى أكثر الأغذية أهمية وكذلك استخداماتها كأعلاف فانه من بين الحبوب الذرة الى جانب القمح يمثلا الحبوب الأكثر أهمية على الإطلاق . منذ خمسة سنوات كان تحول نباتات الذرة وهندستها وراثيا من أحد المشروعات العملاقة فى معامل ومزارع شركة هوكست . لقد تمت محاولات تجريب كل الطرق التقليدية وغير التقليدية دون نجاح . فى عام ١٩٨٩ أصبح فى الإمكان الحصول على نباتات ذرة فى معامل هوكست تحمل جينات المقاومة لمبيد الحشائش

باستا ®Basta . بعد تعاون امتد لسنوات طويلة مع مجموعة فـــى Szeged تـم تطويـر وتطويع الحصول على معلق خلوى جنينى ومنـه أمكـن تجـهيز البزوتوبلاسـت . هـذا البروتوبلاست ظل محتفظا بقدرته على التجديد كما يمكن التجديد وإعـادة خلـق نباتـات خصبة.

مع هذه المادة بدأت دراسات وأبحاث التحول باستخدام البولى ايثلين جليكـول فـى الوسط لتنشيط امتصاص الدنا DNA . بعد تكوين الكالاس فان التحول الموجـب سـوف ينتخب على وسط صلب محتوى على الجلوفوسينات عند مستوى عالى بما فيه الكفاية لقتـل كل الخلايا غير المتحولة . مع تكرار كافى يمكن الحصول على الكالليس وهو جنينى . مـع تغيير الوسط بحيث يحتوى على الجلوفوسينات لوحظ حدوث نمو طبيعى وتكوين الجـذور عند تركيز فى العادة يكون قاتلا لنباتات المقارنة . فى مرحلة لاحقة تم زراعة هذه النباتـات فى التربة مع نباتات المقارنة والحشائش مثل الديجيتاريا والسيتاريا . بعـد معاملـة مبيـد الحشائش باستا بمعدل ١ كجم / هكتار تم قتل جميع الحشائش حيث أن النباتـات المتحولـة بالرغم من بعض الاختلافات فى مستوى التعبير الخاص بالاستيايل ترانسفيين الواقـى لـم تظهر أية أعراض على الإطلاق . هذه الصفة الجديدة ثابتة وتنتقل الى الجيل التالى . لذلـك فان عدد البذور التى يتطلع إليها مازالت صغيرة ومع هذا فانه فى جميع الحالات فان ٥٠% من البذور الناتجة عبوريا من الهجين تحمل الجين وهو سائد ويتبع وراثية منـدل . توفـر نظام مثل هذا قد يسمح حاليا بالاستخدام لحل مشكلة كبيرة فى الزراعة وهى التآكل . علـى مستوى العالم فان حوالى ٦٠% من المساحة المزروعة تتأثر بالرياح والنحر بالماء .

بسبب استخدام المبيدات الحشائشية فى التربة فان حقول الذرة يجب أن تنظف بعـد وقت قصير من الزراعة للتخلص من الحشائش ولكنها لا تحقق الحماية ضد الرياح والمـاء. لذلك أصبح متاحا الآن إمكانية استخدام هذه النباتات بدلا من الرش الخضرى بمبيد الباسـتا. بناء على الكفاءة العالية لمبيد الحشائش وتحمل النباتات فان الفلاح يمكنه الانتظـار حتـى الوقت المناسب للتطبيق وهو الوقت الذى تسبب المنافسة من قبل الحشـائش خفـض فـى الإنتاجية المحصولية . بعد هذا النظام تقل الحشائش ولكن التربة سوف تظل بدون غطـاء لفترة قصيرة فقط بعد عزق التربة . لذلك فان النحر سوف يقل بعد المعاملة يتكون غطـاء من الحشائش الميتة تقوم بحماية الأرض ومنع التآكل أو النحر . لقد تأكد حدوث ذلك فـى حقول الدخان التى أجريت بواسطة مربى النباتات فى فرنسا .

قبل المعاملة فان الاجهاد بسبب الحشائش يكون عاليا حتـى يصـل الـى مسـتوى الضرر. بعد المعاملة مع استخدام كمية قليلة من الباستا فقط تقتل جميع الحشائش ويتكـون

غطاء نباتي جيد من هذه الحشائش الميتة mulch . هذا الغطاء " الملش " سوف يحقق ثلاثة أغراض :

١-يحمى الأرض من التآكل .
٢-يقلل إنبات الحشائش الأخرى الى حين .
٣-يعمل كمصدر للنتروجين على المدى الطويل للمحصول الأساسي . هذا التأثير يجب أن يؤازر باستخدام النباتات التى تخزن النترات مثل الخردل الأبيض (التحميل النباتى) .

بالرغم من حقيقة ان هذه الأفكار يجب ان يتأكد دورها وسلامتها أولا من خلال التجارب والاختبارات الحقلية فانه من الواضح أن الذرة المتحمل الباستا يقدم للفلاح بديل جذاب عن النظام التقليدي لمكافحة الحشائش فى الذرة والذى يتعرض لدراسة جادة الآن حول الثبات والتسرب الخاص بالماء الأرضى .

التحليل الجزيئى لنظام التثبيط الضوئى Photosystem II inhibition : II

كنت مترددا لتناول هذا الموضوع حيث لا توجد حاجة لتأكيد دور النظام الضوئى فى تحقيق فعل العديد من مبيدات الحشائش ولكننى وجدت العنوان جذابا حيث يتناول أحد زوايا البيولوجيا الجزيئية وتثبيط أحد أهم النظم الحيوية فى النباتات وهو النظام الضوئى II كما تناوله البحاث الثلاثة :

A. Trebst , J.Kluth , K. Tietjen , W.Draber .

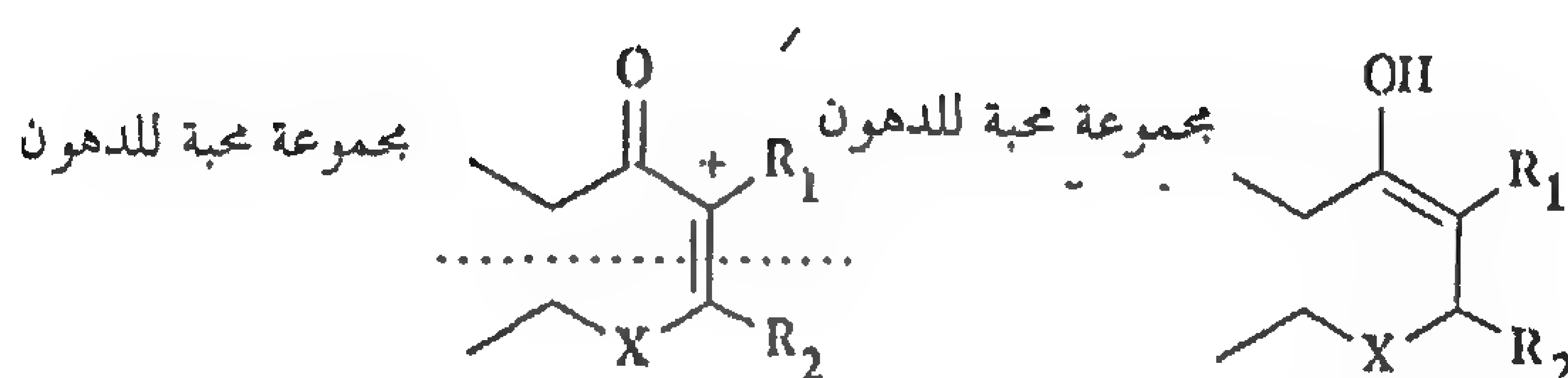
Plant Biochemistry , Ruhr-University , P.O.B. 102148 , D-4630 Bochum , FRG .

Agricultural Research Center Monheim , Bayer AG, D-5090 Leverkusen , Bayerwrk , FRG .

نوعان من مبيدات الحشائش التى تثبط النظام الضوئى PSII

من المعلومات العامة المعروفة أن هناك العديد من المركبات التى تثبط البناء الضوئى من خلال التداخل مع جانب المستقبل الخاص بالنظام الضوئى . العديد من هذه المركبات أصبحت مبيدات حشائش . هذه المركبات تعيق وتسد انسياب الالكترون خلال النظام الضوئى PSII من خلال إحلال واحد من جزيئات البلاستوكونيون يسمى QB من بروتينه المرتبط فى غشاء الثيل أكويد thylakoid من الكلوروبلاست . هناك نوعان من

المثبطات تتداخل مع موقع ارتباط QB للنظام الضوئى PSII الأول يطلق عليه فى العادة النوع التقليدى لعائلة اليوريا / ترايازين والثانى يشمل مركبات الفينول . كلا النوعان يرتبطا بنفس الرابط السائد من البلاستوكونيون على QB أو البروتين الرابط لمبيد الحشائش والذى يطلق عليه الآن مركز النشاط عديد الببتيد D1 . المركبات من عائلتى المثبط تحل محل بعضها البعض فى موقع الارتباط . لكن هذه المركبات أظهرت اختلافاتها فى نظام تثبيط الوظائف (المراجع ١ ، ٢) . مثال ان العلاقة بين التركيب والفاعلية QSAR مختلفا حيث ان كفاءة ودور مبيدات الحشائش يوريا / تريازينون تتبع المعايير الالكترونية بينما المبيدات من النوع الفينولى لا تتبع هذه المعايير . مع هذا فان عنصر التركيب العام لنوعى المثبطات يمكن ان تجهز وهى تدخل العنصر الضرورى الذى جهز سابقا لعائلة النوع يوريا / تريازينون (الشكل ٧-٧) . حيث ان المركبات التابعة لعائلة اليوريا / تريازينون تتداخل مع الهدف فى صورة كربونيل فان المركبات من النوع الفينولى تعمل فى صورة هيدروكسى متوترة tautomeric . لقد أمكن وضع هذا الاستنساخ ضمن أدلة أخرى من المدارات الجزيئية ومقاييس حقول القوى المحسوبة بين الكيتونتريلات / السيانواكريلات ومشتقات الهيدروكسى كونيولين . الاختلافات فى التداخل بين هاتين المجموعتان من المركبات مع البروتين المستهدف لهما نوقشت فى دراسات الطفرية التى ستأتى بعد .



شكل (٧-٧) : عناصر التركيب الضرورى فى نوعى مبيدات حشائش PSII عائلة اليوريا / تريازين تتداخل مع مجموعة الكربونيل المتروكة ، نوع الفينول فى صورة هيدروكسى اليمين . فى حالة ما إذا كانت المجموعة الأولى لا تتطلب احلالات تحت الخط المنقط (مثل اليوريا) فان النوع الفينولى لا يحتاج الإحلال × التى قد يتداخل فى اتجاه أماكن الارتباط ٢١٥ الخاصة به .

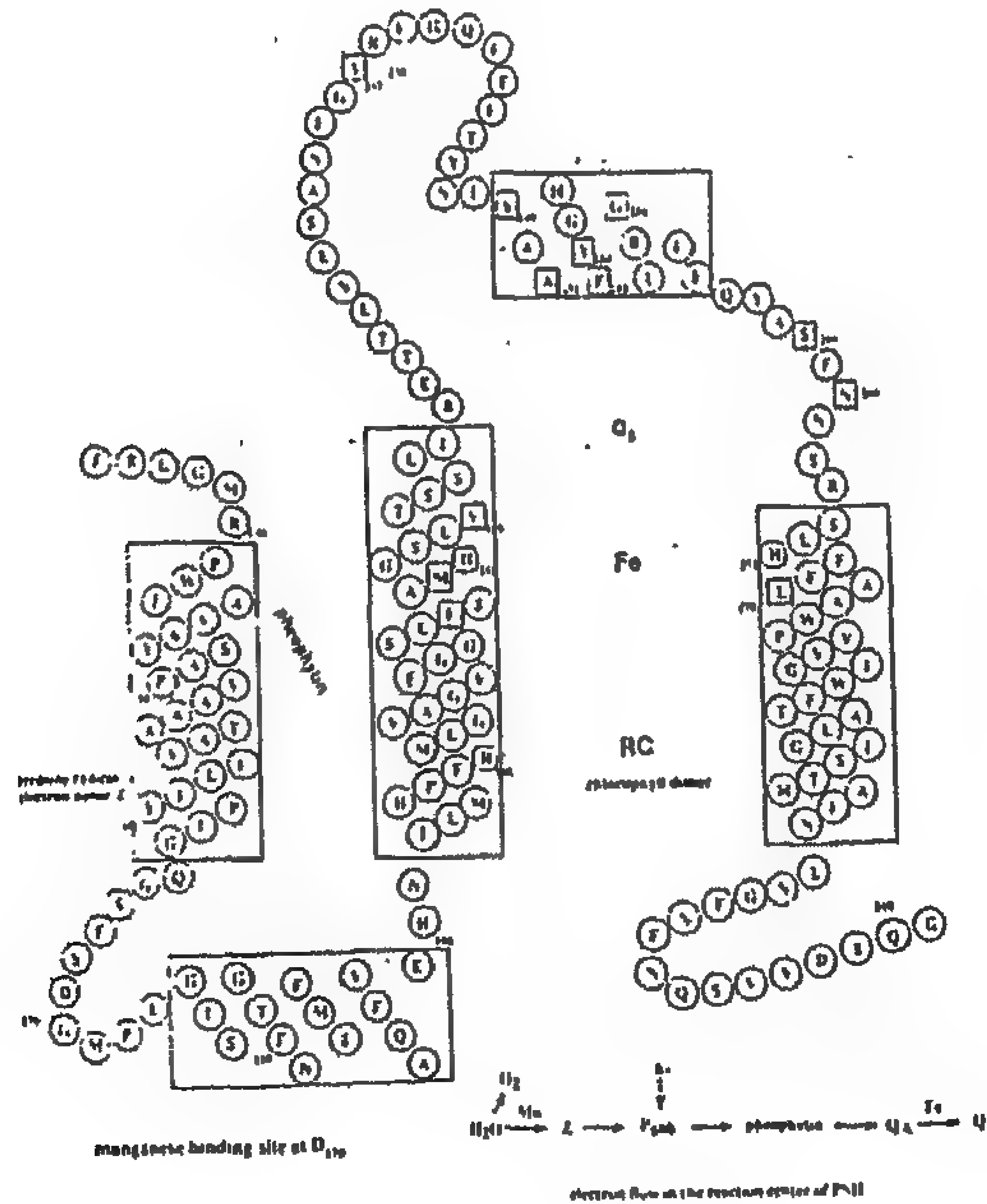
هدف مبيدات الحشائش PSII – بروتين D1

مبيدات الحشائش PSII تثبط البناء الضوئى من خلال إيقاف تدفـــق الالكترونــات الخاصة بالنظام الضوئى II التى تؤكسد الماء الى الاكسجين وتخفــض البلاســتوكوينون . النظام المعقد PSII يتكون من العدد من تحت وحدات عديدة متكاملة من البروتين ٤٧ ، ٤٣ ، ٣٢ (D1) ٣٤ (D2) ، و ٤ (تحــت وحــدات الســيتوكروم 009b) و ٤,٨ Da وزن جزيئى وثلاثة ببتيدات عديدة طرفية . المعقد يحتوى على مركز التفاعل كلوروفيلل ديمر C p 680 , فيوفيتنيز ، c , Ma 4, F بلاســتوكونيون (يطلــق عليــها QA , QB) ، ٢ مجموعة هيم للسيتوكروم b559 وحوالى ٣٠ كلوروفيللس استشعارية . مركز التفاعل لنظام PSII الذى يربط ديمر الكلوروفيلل p680 واثنان فيوفيثينز يتكون من اثنان متجانســان ٣٢ ، ٣٤ kda للبولى ببتيدات D1 , D2 (سيتوكروم b559 – لمزيد مــن المعلومــات يمكــن الرجوع للمرجع (٦) . تحت وحدات البولى ببتيدات D1 تربط البلاســتوكوينون المســمى QB وهذه هى تحت الوحدة التى يمكن ان تربط مبيدات الحشائش فى الموقع QB . البولى ببتيد D2 يربط البلاستوكنيون QB والذى لا يمكنه أن يحل بـــالمبيدات الحشائشــية فــى السنوات الأخيرة تم التوسع فى معرفة الأساسيات الجزيئية والتركيبيـــة لتداخــل مبيــدات الحشائش مع بروتين الرابط D1 . هذا حدث بسبب أن البولى ببتيد D1 ثم التأكد من انــه واحد من مراكز التفاعل للبولى ببتيد الخاص بالنظام الضوئى PSII .

البولى ببتيد D1 يشفر بجين PsbA فى جينوم الكلوروبلاست . عندما تــم كلونــة الجين وتتابع الجين فان تتابع الحامض الأمينى لبروتين D1 أصبح الآن متاحا . لقد أقــترح حدوث ثلاثة أبعاد لتتابع البولى ببتيد . الانثناءات فى الشكل (٧–٨) مبنية على تماثل تتــابع الحامض الأمينى ودليل الهيدروباثى لبروتين D1 للبولى ببتيــد L (M) لمركــز التفــاعل للبكتريا البنفسجية . الأحماض الأمينية الضرورية فى الارتباط الخاص بحوامل الريدوكســى الوظيفية مثل الهستيدينات لمركز تفاعل الكلوروفيلل ديمر Fe والكينونات يحتفظ بــها فــى مواقع متكافئة فى بروتين D1 و L . لقد تم تعريف موقعها فى الانثناءات ثلاثية الأبعاد فــى مركز التفاعل للبكتريا البنفسجية بواسطة تركيب أشعة X لمركز التفاعل المتبلور للــ .Rh Viridis (٩,٨) . النموذج فى الشكل (٧–٨) للانثناءات ثلاثية الأبعــاد لمركــز التفــاعل الخاص بالنظام PSII يمكن أن يبرر احلالات الحمض الأمينى فى الطفرات المتحملة لمبيــد الحشائش فى النباتات والطحلب . لقد وجد من تجانس البولى ببتيــدات D1 , D2 للنظـــام الضوئى PSII فى تتابع الحمض الأمينى والانثناءات ثلاثية الأبعاد فى تحت وحدات , M L فى مركز تفاعل البكتريا البنفسجية أن البروتين D1 الرابط للمبيد ليس مجــرد بروتيــن

الربط QB ولكنه فى الواقع واحد من مراكز تفاعل البولى ببتيدات فــى النظــام الضوئــى PSII . لقد أدى ذلك الى زيادة درامية فى فهم بيوكيمياء النظــام الضوئـــى PSII وكذلــك تداخلاته مع مبيدات الحشائش .

عندما يتم تمثيل ووجود نموذج لارتباط مبيد الحشائش فى نظام الانثناء ثلاثي الأبعاد لبروتين D1 يعرف خمسة طفرات فى تتابعه مسئولة عن التحمل لمبيــد الحشــائش فــى النباتات الراقية والطحالب . حتى الان وجدت احلالات الحمضى الأمينى بواسطة الموقــع المنتخب (تضاعف الحمض DNA فى الخارج وانتقاله وتحوله بعد ذلك) للطفريــة فــى المزارع الخلوية من الدخــان والطحلــب الأخضــر (خاصــة كــلا ميدومونــاس rh) والسيانوبكتريا . لقد تمت الاعلان عن حدوث طفرات جديدة أكثر . كل احلالات الحمضـى الأمينى التى أدت الى تحمل النباتات لمبيد الحشائش تقع فى موقع الارتباط الممثل QB فــى الشكل (٧-٨) . لقد رسمت فى الشكل (٧-٨) كمربعات Leu 275 , own 266 , ser 264 , gly 256 , phe 255 , al 251 , val.219 phe211 .



شكل (٧-٨) : انثناء جزء من تتابع الحمض الأمينى فى البروتين D1

الشكل (٧-٨) يوضح ثلاثة أغشية انتقالية حلزونية وإهيلجتان متوازيتان تشترك فى ربط QB , Fe ، مركز تفاعل الكلورفيلل ديمر P.680 ، الفيوفيثين والتيروسين المانح الأولى للالكترون وموقع ارتباط المنجنيز . مبيدات الحشائش سوف ترتبط فى الموقع QB. مسار تدفق الالكترون من الماء الى QB موضح فى الجانب الأيمن .

بعض تتابعات الحمض الأمينى فى البروتين D1 لا تؤدى الى تغيرات ظاهرة فى نشاط البناء الضوئى أو نشاط ارتباط مبيد الحشائش مما يوضح أن هذه الأحماض الهامة ذات قيمة قليلة . إمكانية تغيير بعض الأحماض الأمينية الضرورية للبروتين دون أن تؤثر كثيرا على خصائصه الوظيفية تثير الدهشة من وجهة أن التتابع عالى التحفز لبروتين D1 (أكثر من ٩٠%) من السيانو بكتريا الى النباتات الراقية ولكنه يفتح إمكانية تضاعف بروتين D1 فى النباتات . من جهة أخرى وجدت أعداد قليلة من طفرات بروتين D1 التى تؤدى الى ظهور كائنات تستطيع أن تخل بالبناء الضوئى حيث النظام الضوئى المعقد PSII غير متماثل أو غير نشط . من الطرق الأخرى ذات الفائدة الكبيرة فى تعريف الأحماض الأمينية الضرورية فى ارتباط مبيد الحشائش والتى لم تظهر فى دراسات الطفرية هى مقدرة العلامات الضوئية . المشتقات الأزيدوية المعلمة إشعاعيا من الترايازينات واليوريا والأيوكسينيل ترتبط اشتراكيا بمجرد التشعيع فى مكان الارتباط المجاور لها على الغشاء . لذلك فان البروتين D1 يحدث له تعليم ثم يعزل حيث يحدث هضم فى المواضع المناسبة بواسطة البروتييز وتتابع البروتين لتعريف الحمض الأمينى الذى سيحدث له تحوير . عن هذا الطريق أمكن تعريف أربعة أحماض أمينية أكثر فى موقع الارتباط كما هو واضح فى الشكل (٧-٨) فى الصناديق : tyr 254 , val.249 , tyr 237 , met 214 .

عبور المقاومة فى النباتات التى تتحمل مبيد الحشائش Cross resistance

لقد تم دراسة إمكانية حدوث مقاومة عبورية لمبيدات الحشائش المختلفة فى الطفرات الموجودة فى بروتين D1 للنباتات الراقية والطحالب الخضراء وكذلك السيانوبكتريا . قليل من البيانات عن المقاومة العبورية لخمسة طفرات فى الطحلب الأخضر كلا ميدوموناس rh موجودة فى جدول (٧-٢) عن ويلدنر وآخرون (١٩٨٨٩ . توضح هذه الأمثلة القليلة ان بعض احلالات الحمض الأمينى فى البروتين D1 تؤثر على المثبطات المختلفة بشكل مختلف . قد يكون هناك بقايا من بعض الأحماض الأمينية فى تلامس مع واحد من مبيدات الحشائش ولكن ليس من الضرورى أن تكون ملامسة لحمض أمينى آخر . احلالات بقايا هذا الحمض فى الطفرة سوف يؤثر على كفاءة وقابلية الارتباط للمثبط الأول وليس الأخير. من الأمور المحددة أنه فى الواقع العملى أنه مع كل الطفرات التى وجدت أو التى صممت

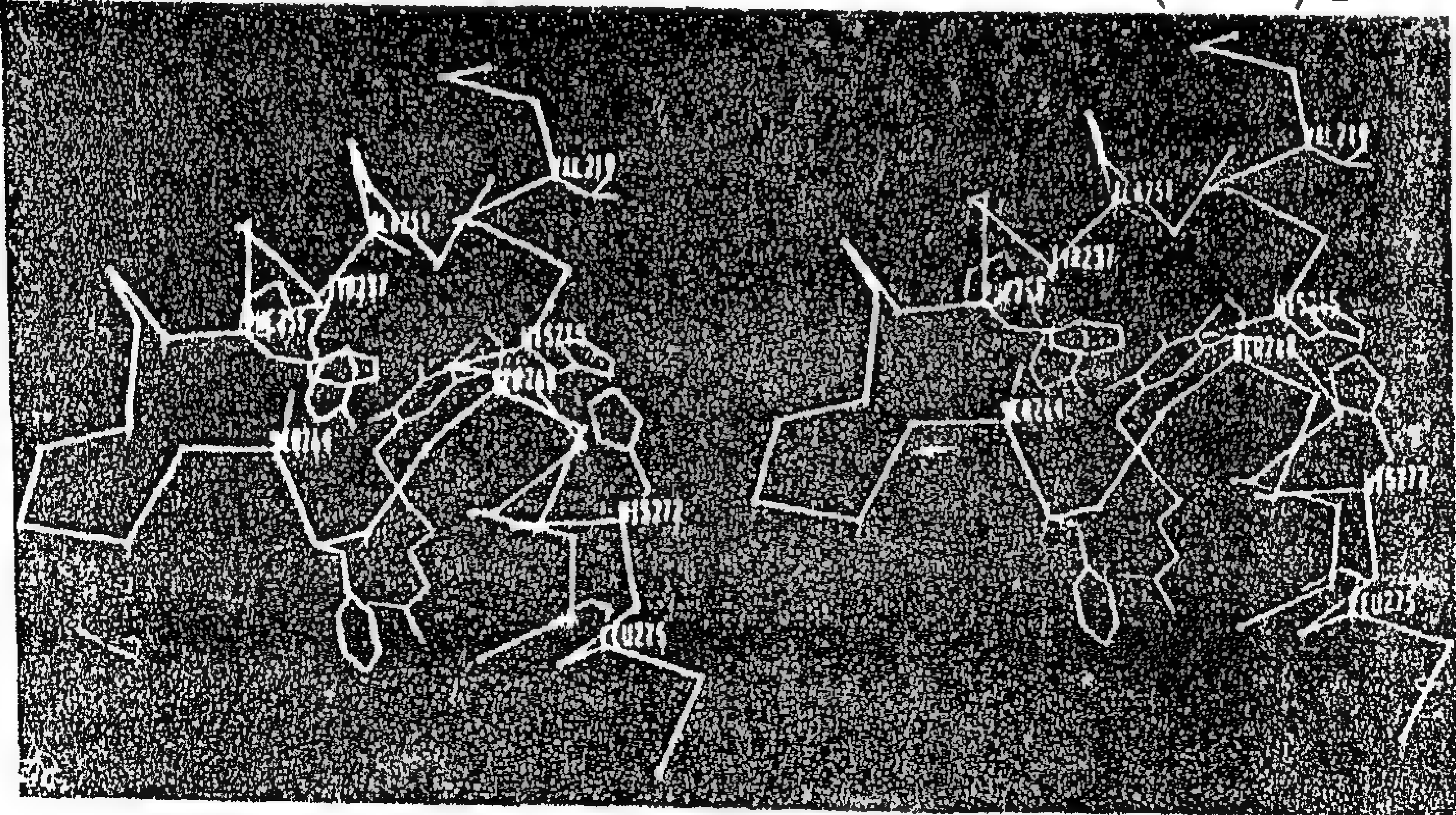
لتحقيق تحمل لمبيد الحشائش فى البروتين D1 فان المثبطات من نوع الفينول لـــم تظـــهر فاعلية أقل كما فى الكلاميدوموناس rh (جدول ٧-٢) . لقد وجــد بعــض التحمــل لمبيــد أيوكسنيل فى الاحلال val.219 فى الكلاميدوموناس وفـــى طفــرة aan 266 فـــى الـــ Synechocystis . من جهة اخرى فان مشتقات البرومونيتروثيمول وحتـــى الكونيوليــن والكيتونتريل لم تفقد مقدرتها على التثبيط فى الطفرات كما هو موضح فى الجـــدول . فـــى الواقع حدث العكس حيث أن هذ المشتقات نشاط أكثر . كان ذلك حقيقيا مع طفــرة Ser264 على وجه الخصوص . السيرين – أ يد (الهيدروكسيلى) يقدم رابطة ايدروجين لواحدة من مجاميع الكربونيل للبلاستوكونيون . الطفرة فى الانين تحقق التحمــل للمثبطــات التقليديــة ترايازين / يوريا ولكنها لا تحدث نفس الشيء مع المثبطات الفينولية . هذا يعتبر اختــــلاف واضح ومحدد فى صفة الارتباط لهذين النوعين من المثبطات واللذان يقعــا تحــت عائلــة السيرين والهستيدين . قد يعتقد ان الفينولات كما لو كانت مشتقات أنــواع أشــباه الكينــون البروتونية للبلاستوكوينون (الشكل ٧-٨) . قد تحتاج الى احــلال × يتداخــل فــى اتجــاه الهستيدين ٢١٥ (وهــو مــانح كوبــرى الايدروجيــن لمجموعــة الكربونيــل الأخــرى للبلاستوكونيون) . إزالة مجموعة ايدروكسيل السيرين فى الطفرة سوف تعول مجموعــــة الايدروكسيل أفضل ومن ثم تؤدى هذ الطفرة الى زيادة المقدرة على ارتباط هذه المجموعــة من المركبات . هناك مثال آخر مثير للدهشة خاص الحساسية الفائقة للمثبطات فـــى التنبــؤ بزيادة كفاءة الترايازينوات كما فى المثبطات التقليدية من هذا النــوع . مــع بعــض نظــم الاحلالات فان بعض الترايازينونات تكون أكثر حساسية فى طفرات الكلاميدوموناس كمـــا فى الجدول (٧-٢) . مثال آخر عن دور احلال مبيد الحشائش نفسه فى تحقيـــق المقاومــة العبورية واضح من سلوك مشتقات الثيازول فى طفرات الكلاميدوموناس (جـــدول ٧-٢) . من الواضح أن نوع NH من الثيازولات توجه بشكل مختلف فى موقـــع الارتبــاط تبعــا لاستجابتها لاحلال الحامض الأمينى فى الطفرات عما هو الحال مع ثيازولات النوع -S .

جدول (٧-٢) : التغير فى كفاءة المثبط فى مبيدات حشائش النظام الضوئـــــى PSII فـــى الطفرات فى الموقع QB فى الكلاميدوموناس rh .

inhibitor	substitution			pI_{50}					
triazinone	R_1	R_2	R_3	wild-type	mutant M71 mutation: Ser264	M73 Ala251	M74 Leu275	AR207 Phe255	DR1 Val219
metribuzin	NH_2	SCH_3	t-butyl	7.3	3.6	4.6	5.9	7.5	6
metamitron	NH_2	CH_3	phenyl	5.5	4	3.4	4.7	6	5.4
DRW 2862	NH_2	SH	2,5-chlorophenyl	5.6	6.8	6	6.2	6.3	5.3
DRW 2686	H	SCH_3	$4\text{-}CF_3O$-phenyl	5	6.8	6	6	6	4.7
DRW 2706	CH_3	SCH_3	$3\text{-}Cl\text{-}4\text{-}CF_3O$-phenyl	5.8	7.4	5.9	6.7	6.8	5.2
DRW 2689	CH_3	$NHCH_3$	$3\text{-}Cl\text{-}4CF_3$ phenyl	5.8	4.8	4	6.1	6	4
bromonitrothymol				7.3	7.7	6.4	7.1	7.5	7
hydroxyquinoline	[illegible]			7	7	7.2	7.4	7.4	7.3
ketonitril	[illegible]			7.8	8	8.1	7.7	8	8
thiazoles	X	R_2	R						
KUX 3084	S	H	2,4-dichloro-	6.6	4.5	5.2	8	7	6.5
KUX 3076	S	H	4-chloro-	7.1	4.4	4.6	8	7.3	6.9
KUX 3436	NH	CH_3	4-cinoro-	6.6	5.8	7.5	6.6	6.6	6.6
KUX 3755	NH	CH_3	3,4-dichloro-	6.8	6.1	8	7.4	6.9	7

النموذج ثلاثى الأبعاد والوضع الجزيئى لموقع QB وموقع ارتباط مبيد الحشائش فى البروتين D1

لقد تم نشر مناظر ثلاثة الأبعاد للانثناءات فى جزء تتابع الحامض الأمينى الخاص بالبروتين D1 . لقد استغل كاتب هذا المقال كل المعلومات التى تجمعت عن المقاومة العبورية أو زيادة الحساسية للعديد من مركبات التثبيط التى تتداخل مع النظام الضوئى PSII فى الطفرات المختلفة مع احلالات مختلفة من الحامض الأمينى كما هو واضح فى جدول (٧-٢) لنمذجة المركبات فى الارتباط QB على البروتين D1 للنظام الضوئى PSII الرسم الجزيئى باستخدام السوفتوير Sybyl على محطة إيفانز وسوثرلاند بدأت مع التنسيق من توجيه اليوبى كونيون والتربيترين فى وحدة L من مركز تفاعل Rh. Viridis والذى يتجانس مع النظام الضوئى PSII كما نوقش قبلا . اختلاف الأحماض الأمينية فى تحت الوحدة L من بروتين D1 ثم احلاله بالتتابع ولكن هناك ثلاثة أحماض أمينية إضافية فى البروتين D1 بين e , de . النموذج الذى نحن بصدده يعتبر أن السيرين ٦٤ ، متجانس مع السيرين ٢٢٣ فى مركز التفاعل البكتيرى . على نسق التتابع فان سلسلة الببتيد قبل السيرين ٢٦٤ وبعد السيرين ٢٦٤ تختلف بشكل كبير في البروتين النباتى عن بروتين البكتريا . توجيه البلاستوكونيدون فى نموذج ارتباط مبيد الحشائش موضح فى الشكل (٧-٩) . الطفرات الخمسة للكلاميدوموناس والتى تناولتها الدراسة موضحة فى الشكل (٧-١٠) أما توجيه الميتاميترون والميتريبوزين وكذلك السيانوكريلات واثنان من الثيازولات موجودة فى الأشكال من (١١-١٤) .



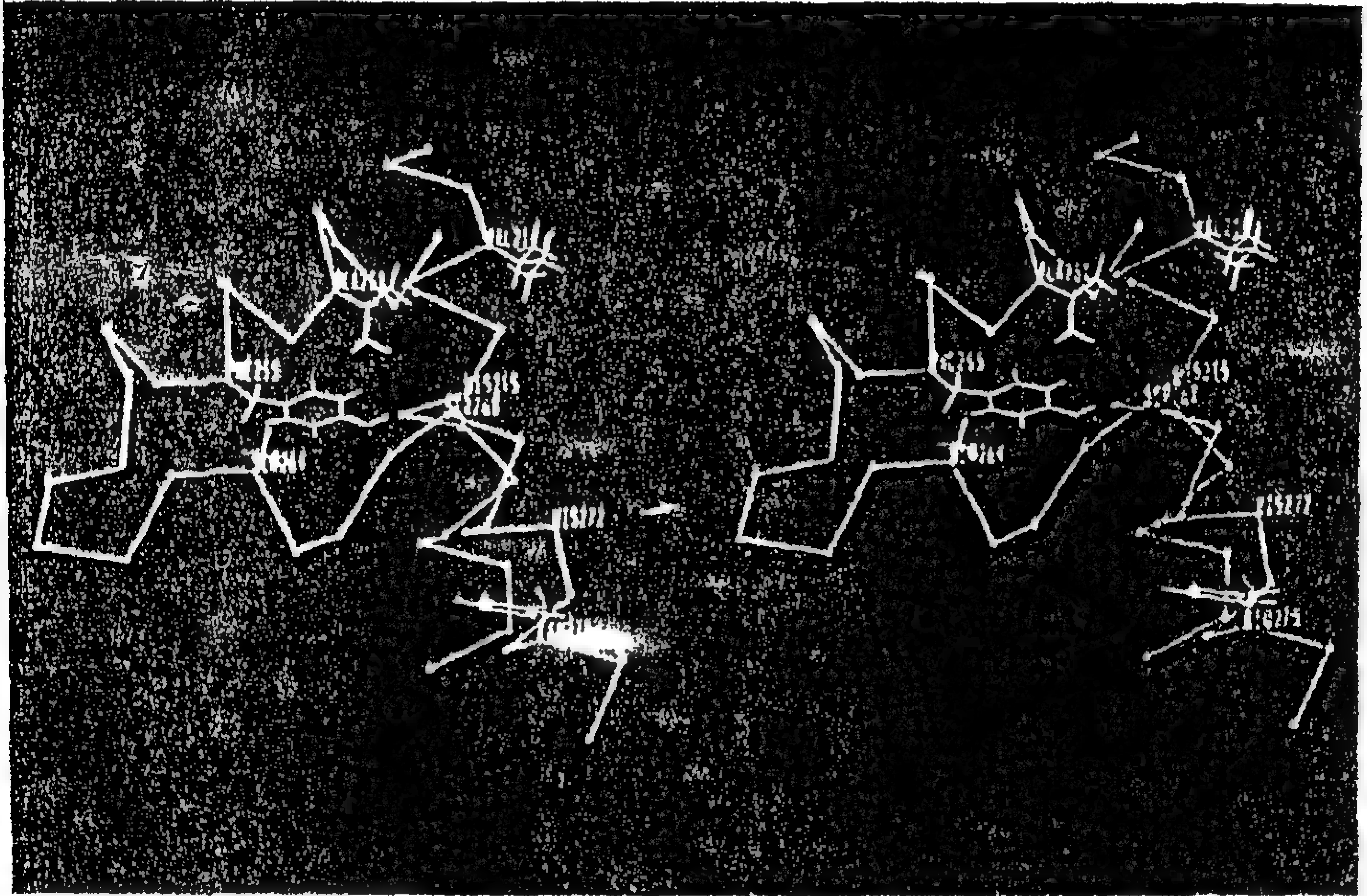
شكل (٧-٩) : الرسم الفراغى لتوجيه البلاستوكونيون فى موقع QB فى البروتين D1

فعل مبيد الحشائش فى نظام التثبيط الضوئى فى PSII عند موقع مستهدف إضافى

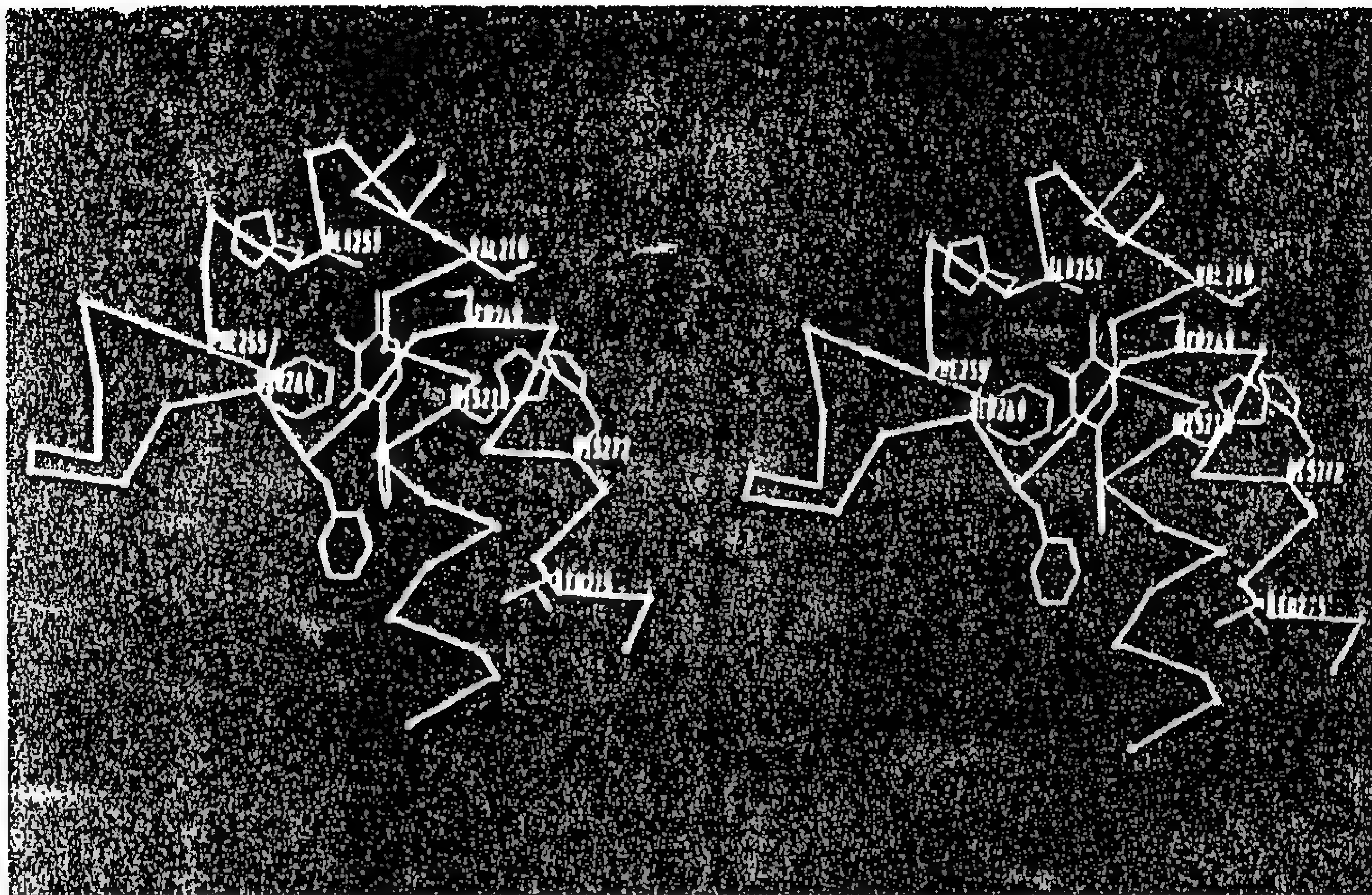
باستثناء التيروسين ٣٧ ، فان كل الأحماض الأمينية التى تساهم فى ارتباط مبيد الحشائش فى البروتين D1 (كما فى الشكل ٧-٨) تقع فى مساحة صغيرة نسبيا فى قمة الأهاليج IV للغشاء الناقل ، والاهليج الموازى والتابع الذى يربط الاهليجين الآخرين . هذا الجزء تم نمذجته فى الأشكال من (٧-٩) وحتى (٧-١١) . هذه المساحة مشابهة لحد كبير لموقع الارتباط QB فى مركز تفاعل البكتريا البنفسجية فيما عدا التتابع الارتباطى بين الاهليج المتوازى والاهليج ٤ والتى تتطلب نظام انشاء جديد . التيروسين ٢٣٧ فى تتابع الارتباط الطويل للاهليج IV مع الاهليج الموازى والتى تبدو من الوهلة الأولى بعيدا عن الأحماض الأمينية الكبرى فى موقع ارتباط QB . التتابع حوالى ١٥ حمض أمينى أطول فى بروتين D1 للنظام الضوئى PSII عن التتابع المكافىء فى تحت الوحدة L للنظام البكتيرى. التعليم الاشعاعى للتيروزين ٢٣٧ بواسطة الأزيدومونيرون أدى الى الاقتراح بان هذا التيروسين جزء من ارتباط مبيد حشائش اليوريا الأصل ويوجه ناحية موقع الارتباط QB كما هو فى الشكل (٧-٩) . هذا الموقع قد يمثل دورا هاما فى كيفية إحداث فعل مبيدات الحشائش فى النظام الضوئى PSII لأن هذا الموقع يشترك فى إعادة تنظيم البروتين D1 وكذلك فى انهيار بروتين D1 فى التثبيط الضوئى . إعادة التنظيم السريع تبدأ بإنقسام البروتين D1 بالقرب أو عند تتابع QEEE (ارجع للشكل ٧-٨) . إعادة التنظيم السريع لبروتين D1 يمنع بمبيد الحشائش الديورون . التيروسين ٢٣٧ قد يلعب دور فى توصيل المبيد المرتبط مع تثبيط إعادة التنظيم السريع . بالرغم من أن فسيولوجية إعادة التنظيم السريع لم تتضح بشكل كافى بعد فانه من الواضح أن النظام الضوئى PSII فى الضوء الزائد تتحطم باستمرار حتى مع ظروف النمو العادية بما يطلق عليه التثبيط الضوئى . هذا التحطيم لبروتين D1 فى التثبيط الضوئى يحدث له اصلاح لكى يعاد نشاط البناء الضوئى . بروتين D1 المحطم يجب ان يؤخذ بعيدا عن النظام الضوئى PSII للاصلاح كما يجب أن يغير ويحدث له احلال بواسطة بولى ببتيد مخلق جديد . إعادة النشاط والاصلاح توقف بفعل مبيدات الحشائش من الأنواع التقليدية . يبدو من الأهمية أن من أهم كيفية إحداث الفعل الخاص بمبيد الحشائش على البناء الضوئى التداخل مع عملية التنظيم هذه . هذا التنظيم يحدد ويحقق الفاعلية ونشاط مبيد الحشائش فى الموقع QB .

السد أو الإيقاف المستمر لاصلاح النظام الضوئى PSII بواسطة مبيدات الحشائش له تتابعات أبعد على ثبات مكونات أخرى لنظام PSII وكذلك على كل مكونات جهاز البناء الضوئى بما فيها الصبغات . هذا قد يكون السبب فى ان مبيدات حشائش التى تعمل على

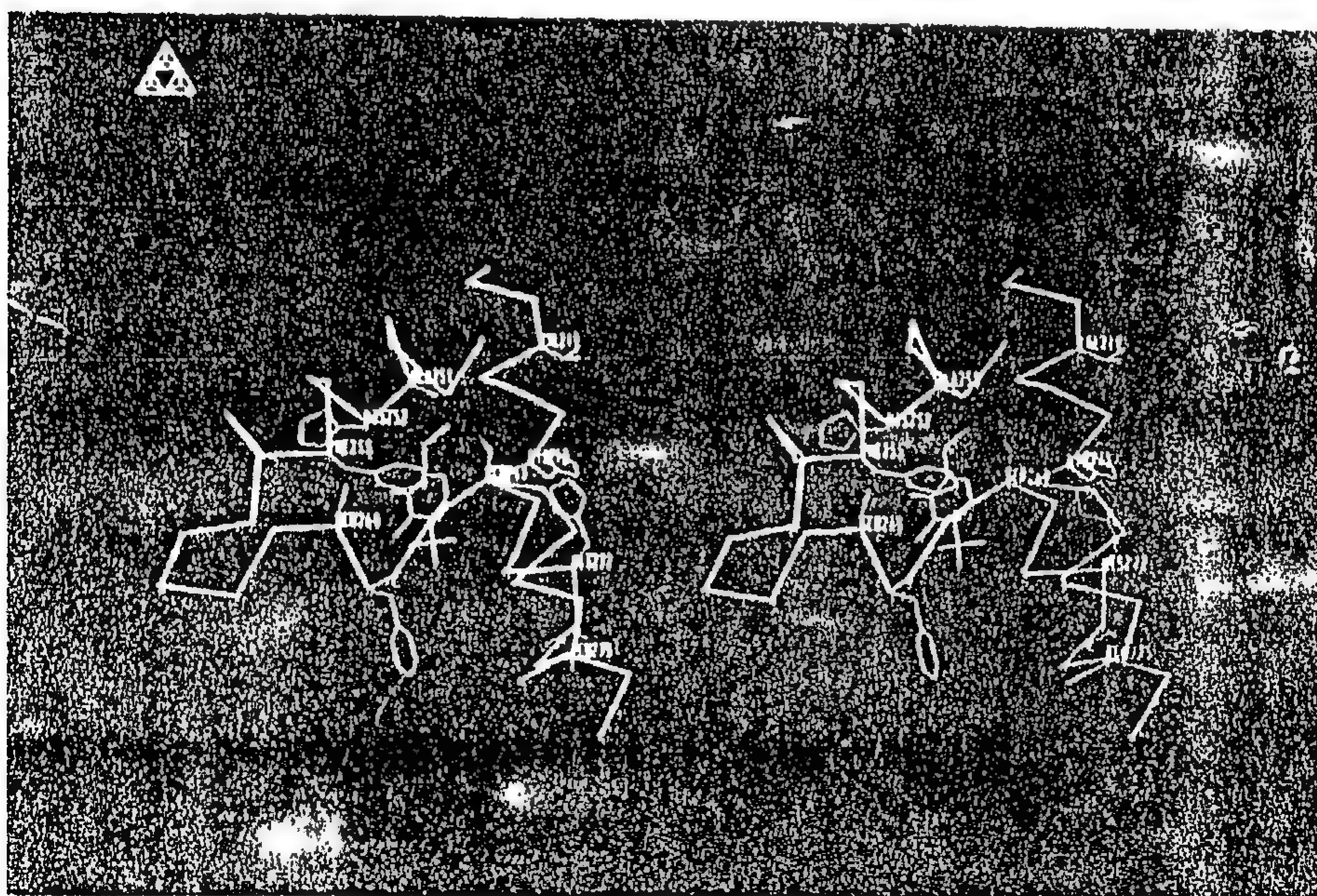
النظام الضوئى PSII لا توقف البناء الضوئى (التجويع Starvation) ولكنها تعمل كمبيدات حيوية واقعيا . بعض مثبطات النظام الضوئى PSII مثل الفينولات لا توازر فعل مبيدات الحشائش فى الداخل In vivo ولكنها تحدث تثبيط فعال فى التحاليل خارج الخلايا in vitro . هذه المثبطات قد تتداخل مع الموقع المستهدف المحتمل عند التيروسين ٢٣٧ بطريقة أخرى عن المثبطات النشيطة كمبيدات حشائش مثل اليوريا .



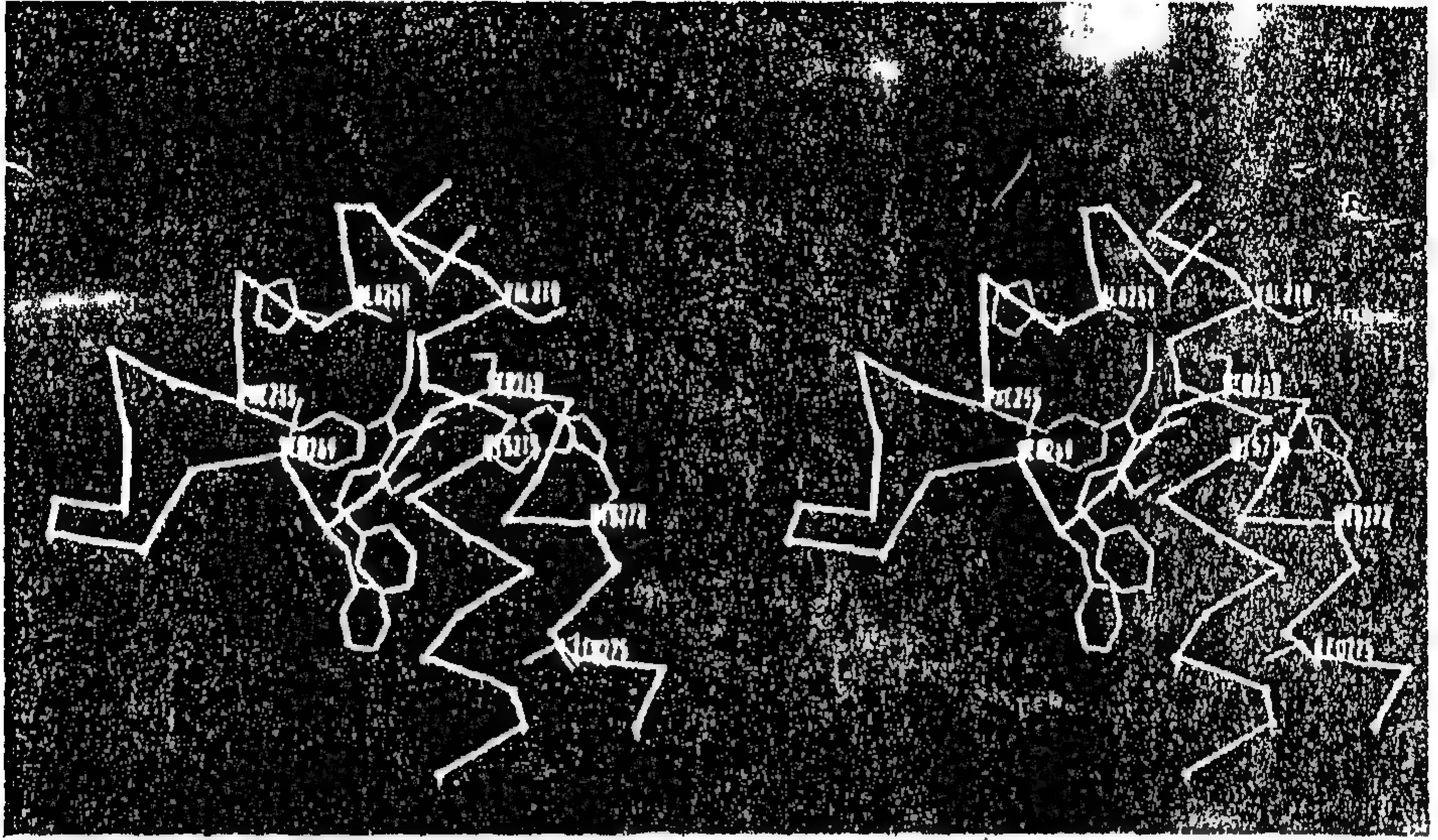
شكل (٧-١٠) : الرسم الفراغى لموقع QB للبروتين D1 يوضح الأحماض الأمينية المطفرة عبر دراسات المقاومة العبورية (جدول ٧-٢) .



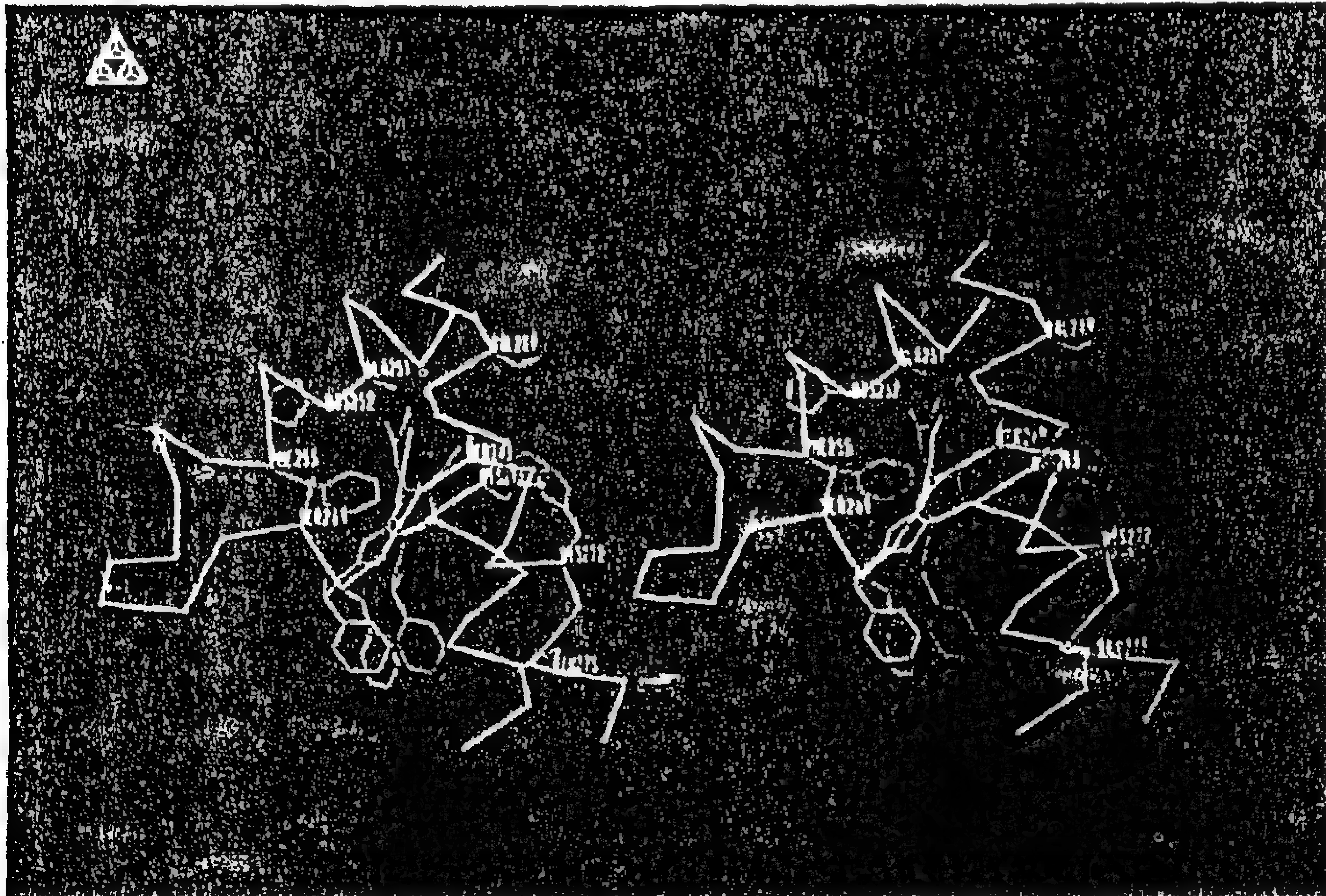
شكل (٧-١١) : رسم فراغى للميتاميثرون على الموقع QB فى البروتين D1 على نسق الشكل (٧-٩) .



شكل (٧-١٢) : رسم فراغى للميتروبيزين فى الموقع QB فى البروتين D1 كما فى الشكل (٧-٩) .



شكل (٧-١٣): رسم فراغي للسيانو اكريلات في موقع QB في البروتين D1 على نسق الشكل (٧-٩)



شكل (٧-١٤) : رسم فراغى لمركب S- ثيازول ، NH ثيازول فى الموقع QB فى البروتين D1 كما فى الشكل (٧-٩) .

REFERENCES

Barber, J., (1987). Trends Biochem. Sci. 12, 321-326.

Bowyer, J., M. Hilton, J. Whitelegge, P. Jewess, P. Camillen, A. Crofts, H. Robinson, Z. Naturforsch 45c (1990). 379-387.

Kluth,J.F., K.G. Tietjen, R. Andree, G. Ewald, W. Oettmeier, A. Trebst (1990). In Proc. of the IUPAC Congr. Hamburg, in press.

Kyle, D.J., I. Ohad, C.J. Amtzen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 4070-4074.

Mattoo, A.K., H. Hoffmann-Falk, J.B. Marder, M. Edelman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984). 1380-1384.

Mattoo, A.K., J.B. Marder, V. Gaba, M. Edelman, in Regulation of Chloroplast Differentiation, Alan R. Liss, New York 1986, pp. 607-613.

Mets, L., E.C. Hermann, C. Kotter, A. Trebst, B. Depka, H. Wictoska, Z. Naturforsch (1987). 42c, 704-712.

Octtmeier, A. Trebst in Y. Inoue (Ed.). (1983). The Oxygen Evolving System of Phytosynthesis, Academic Press Japan, Tokyo, pp. 411-420.

Trebst A. (1990). in J.C. Caseley (Ed.) Proc. 11th Long Ashton Int. Symposium "Herbicide Resistance", Butterworth Publ. in press.

Trebst, A., B. Depka, B. Kraft, U. Johanningmeier, Photosyn, Res. 18 (1988). 163-177.

Trebst, A., W. Donner, W. Draber, Z. Naturforsch. (1984). 39c, 405-411.

Trebst, A., W. Draber, (1986). Photosyn. Res., 10, 381-392.

الباب الثامن
التكنولوجيا الحيوية صناعة بلايين الدولارات

مقدمـــــــة :

هذه المقالة مأخوذة عن العالم الكبـــير Vedpal S.Malik مـــن ، 20737MD Riverdale , River Road 4700 , USDA , Aphis بالولايات المتحدة الأمريكية . لقد أثارني العنوان بالرغم من أن الكل يعرف أن أي تكنولوجيا تتطلــب اســتثمارات بملاييــن الدولارات مثل المبيدات حيث أشارت الإحصائيات في هذا الصدد أن المبيد الجديد يتكلـــف حوالي ١٥٠ مليون دولار منذ البداية وحتى التسويق . لكن التكنولوجيا الحيوية والتي تشـير الى البحث عن كل ما هو طبيعي حيوي أو كيميائي من مصادر حيوية تتكلف البلايين ولكل مؤيد ومعارض . لقد أشار الكاتب الـى مقولـة Manusmriti ٩ : ٣٨ عـام ٤٠٠ قبـل الميلاد:

" حتى في حالة الكرة الأرضية فان التقاوي إذا زرعت في نفس الحقل وفي نفـــس الوقت فأنها تنمو بصور وأشكال مختلفة تبعا لطبيعتها " . وسوف أضعها بالإنجليزية :

Even in the case of the Earth , if seeds are sown in the same field and at the same time , they will grow in different forms depending on their nature .

- Manusmriti 9 : 38
- 400 B.C.

التكنولوجيا هي تسخير النظم الحية والكائنات الحية لخدمة الإنسان . بسبب الثـــورة التكنولوجية الحديثة في مجال الطرق البيوكيميائية فان المجال القديم الخـــاص بتكنولوجيـــا التخمر تم تحديثها (كروجير وكروجير ، ١٩٨٢ ، موسوعة العـــالم الواســـع ، ١٩٩٥) . استطراداً للتعريف المشار إليه أعلاه ظهرت البيوتكنولوجيا التي تشمل العمليات التي تستغل وتسترشد بآلية التمثيل الواسعة لمكونات الكائنات الحية لإنتاج الممثلات القيمة الهامـــة مـــن المصادر المتجددة . هذا الاتجاه يسارع الزمن بسبب الزيادة الرهيبة في تعداد سكان الكـــرة الأرضية ومحدودية وانحسار المواد الخام ذات الأهمية . يمكـــن أن تســـتخدم التكنوولجيـــا الجديدة لخلق مصادر جديدة ومواد جديدة كذلك . الهدف الأساسي والنـــهائي للتكنولوجيـــا الحيوية يتمثل في إحلال تخليق الكيميائيات الذي يحتاج لطاقة رهيبة ويخلق مشاكل تلـــوث

بغيرها من نواتج تكنولوجيا الميكروبات التى تتطلب طاقة أقل نظيفة ولا تحدث مشاكل بيئية خاصة بالتلوث . فى هذا السبيل فان الآليات الحيوية biological machineries يمكنـــها أن تحول المخلفات والملوثات السامة الى تراكيب كيميائية معقدة يصعب محاكاتها كيميائيـــا (جدول ٨-١) .

الكائنات الحية الصناعية The industrial organisms

التنوع البيوكيميائى والمنتجات الجديدة

تلبية لمتطلبات الحرب العالمية الأولى قام العالم الالمانى Neuberg باستخدام واسع النطاق للتخمر بالخميرة لإنتاج الجليسرول . فى الجـــانب البريطـــانى اســـتخدم البـــاحث Weismann الكلوستريديوم لإنتاج الأسيتون – بيوتانول . حتى مع هذه الاتجاهات الحيوية تم احلال التخمر بتكنولوجيا الكيميائيات مما خلق حماس وتحريض نحو الإنتاج الصنـــاعى لحامض الستريك بواسطة فطر الاسبرجيلليس ينجر . لقد تم الإنتاج التجارى للبنسلين فـــى الأربعينيات من خلال التخمر وكان ذلك شديد النفع والفائدة للحلفاء فى الحرب (Hobby ، ١٩٨٥ ، Crease ، ١٩٨٩) وكان ذلك واستمر حماس النصر دافعـــا لإنتـــاج منتجـــات ميكروبية نافعة للإنسان (الجدول ٨-٢) . سوف نشير الى بعض محتويات الجـــدول (٨-٣) التى يحتوى على قوائم عديدة للمنتجات التجارية التى تحصل عليها بواســـطة التكنولوجيـــا الحيوية .

الكائنات الحية مصدر للعديد من المنتجات الهامة القيمة ذات الـــتراكيب الكيميائيـــة الواسعة والنشاط البيولوجى العريض . مثال ذلك أن أكثر من ٦٠٠٠ مضاد حيـــوي تنتـــج بواسطة الكائنات الدقيقة وان أكثر من ١٥٠ منها تم وصوله للنطـــاق التجـــارى . المـــواد المضادة للطفيليات مثل الأفيرميكتينات avermectins تنتج ميكروبيا . النواتج الميكروبيـــة مثل Levastatin تستخدم لخفض ضغط الدم ونواتج سكلوسبورين والراباميســـين و FK-506 كمنشطات لأجهزة الدفاع فى العائل ضد مسببات الأمراض (Heitman وآخـــرون ، ١٩٩١) . مركب التاكسول منتج نباتى ذات نشاط مضاد للأورام antitumor .

لقد تعدى سوق المضادات الحيوية ما يزيد عن ١٢ بليون دولار أمريكى سنويا . لقد بلغ حجم سوق المضادات راينتيدين ولاكابتوربريل ولاينفيديبين ما يزيد عن واحـــد بليـــون دولار لكل منها . لقد أصبح كنوع من الهوس العقلى الحصول على منتجات البليـــون دولار هذه . لذلك أصبحت البيولوجيا الجزيئية ذات تأثير ودور كبير فى اكتشافات الدواء . هـــذه التكنولوجيا الجديدة تقدم وسائل جديدة للكشف والتحليل . المضادات الحيوية للاســـتخدامات الإنسانية وكذلك كلونة وتعبير مستقبلات الدواء فى الإنسان والحيوانات المهندســـة وراثيـــا

أصبحت تستخدم كأهداف لتقييم فاعلية وكفاءة وتأثيرات المواد العلاجية . مثال ذلك ما تحقق فى التعبير بالمستقبلات الإنسانية $5HT_{1D1}5HT_2$ فى خطوط الخلايا غير الإنسانية وغير العصبية (صفائح ألياف الفئران Fibroblasts) . والتى لا تعبر مستقبلات المونوأمين . بعض تحت أنواع المستقبلات لنفس الناقلات العصبية قد تنتمى الى قسم خاص . الكلونة والتتابع يمكن أن تحدث باختلاف بين تحت أنواع المستقبلات وتعريف أهداف جديدة لفعل الدواء فى النظام الخاص بالإشارات بين الخلوية (King وآخرون ، ١٩٩٠ ، Ecker ، ١٩٧٧) . أن قوة وكفاءة نظام الكشف يعتبر المفتاح لإيجاد مركبات متخصصة من الكائنات الطبيعية (Gill وآخرون ، ١٩٩٠) أو من برامج التخليق الكيميائى .

بوجه عام فان إنتاجية الكائنات الحية التى عزلت مباشرة من الطبيعة (النوع البرى) لا يحقق مطالب الإنتاج الصناعى . تستخدم الطفرية و/أو التربية لزيادة وتحفيز مخرجات المنتج المستهدف (Malik ، ١٩٧٩) . فى الماضى كانت طرق النجاح والفشل hit or miss (الصواب والخطأ) للوراثية التقليدية ذات محدودية فى تحسين عمليات التكنولوجيا الحيوية . الآن أصبحت تكنولوجيا دمج الحامض النووى DNA تقدم طرق جديدة للتحوير بما يمكنها من إصدار الأوامر لجينومات الكائنات الحية بأسلوب مباشر (Malik ، ١٩٨١) لقد أمكن التغلب علي عدم التوافق الوراثى بين الأنواع والقيود فى الوراثية التقليدية من خلال التكنولوجيا الجديدة . بسبب التقدم الحديث فى طرق الكشف والتقدير والتحليل الحيوي وغيرها أصبح في الإمكان إحداث التضاعف الوراثي فى البيولوجيا الجزيئية للعديد من الكائنات الحية بشكل سريع ومذهل (Smith وآخرون ، ١٩٩٠ ، Berka وآخرون ، ١٩٩١) . نتيجة لهذا التقدم المذهل أصبح فى الإمكان إدخال معلومات وراثية إضافية من كائنات غير متوافقة جنسيا الى الكائنات الموجودة طبيعيا (غير متوافقة معها) . لذلك فان إيجاد (ليس خلق إنما هو نسخ ... تبارك الله أحسن الخالقين ...) كائنات حية جديدة لم تكن موجودة أصلاً فى الطبيعة ذات كفاءة ومقدرة تمثيلية جديدة أصبح الآن من الأعمال الروتينية . البيولوجيا الجزيئية أصبحت وفى نهاية المطاف تحقق إسهامات فى اتجاه تطوير منتجات تجارية جديدة كما أن الطرق البيولوجية الجديدة خلقت ونشرت صناعة جديدة ذات مردودات عالية ورهيبة بما يطلق عليه الآن التكنولوجيا الحيوية "biotechology" .

لقد كانت هذه فترة خاصة للتقدم السريع فى التكنولوجيا الحيوية (جدول ٨-٤) . العائدات من مختلف المشروعات التى تناولت صناعة الدواء من خلال هذه التكنولوجيا موجودة فى الجدول (٨-٥) . لقد تكونت مئات من الشركات الصغيرة الديناميكية للعمل واللحاق بركب التكنولوجيا الجديدة المتقدمة . بعض من هذه الشركات مثل البيوجين ، كيرون ، جين تيك ، أمجين أصبحت تحتل نصيب لا بأس به من سوق التكنولوجيا الحيوية

من خلال تقديم مجموعة كبيرة من المركبات الفعالة . لقد أصبح فى الأسواق الآن جزيئات حيوية ذات قيمة كبيرة مثل المضادات الحيوية والفيتامينات والهورمونات وخافضات المناعة ومضادات الأورام والمواد المضادة للطفيليات ومواد التشخيص والانزيمات والكيميائيات النقية ومبيدات الآفات والبوليمرات الحيوية والفاكسينات والأحماض الأمينية وغيرها .

إن تخليق مركب جديد على مستوى المعمل هو الخطوة الأولى فى طريق طويل تجاه الإنتاج وتسويق المنتج الجديد . لتحقيق أعلى نجاح يجب توفير الظروف المثالية والارتقاء بالتجارب السريرية للوصول الى ما يتوافق مع متطلبات الوكالات التشريعية وما يصل بالمنتج الى مراحله النهائية من تعليب وتسويق . كل هذه الخطوات تتطلب سنوات عديدة ومجهودات كبيرة وتكاليف باهظة حتى يستكمل المشوار ويتحقق الهدف والنجاح لذلك فان الشركات الصغيرة التى دخلت مجال التكنولوجيا الحيوية عرفت من البداية أن تحقيق النجاح يتوقف على اختيار الاتجاه المناسب بعناية فائقة حتى تكون المكاسب والعائدات ضخمة كذلك بما يتناسب ويتعدى حدود الاستثمار الضخم فى هذه التكنولوجيا وسوف يشهد هذا القرن الواحد والعشرين سيادة المنتجات الحيوية الآمنة بما يحقق الفوائد للإنسان فى حياته وبيئته واستمرارية حياة المجتمعات الإنسانية .

العالم الحي :علاج شافي عامً أو إكسير للجينات الجديدة Panacea of Living genes

بسبب صغر حجم الجينوم فى الكائنات الدقيقة فان الجينات يسهل عزلها من هذه الكائنات عما هو الحال مع صورة الحياة الراقية . على عكس أو خلافا للجينات الأولية eukaryotic فإن جينات البكتيريا عادة لا تملك انترونات ومن ثم يسهل التعبير عنها فى الكائنات الحية الأخرى . لذلك فان العديد من الكائنات الحية يسهل انتخابها لبعض الأنشطة البيوكيميائية مثل انهيار المركب السام أو النمو على بيئة خاصة . فى هذا السبيل فان العديد من الكائنات الدقيقة تم انتخابها من الطبيعة لوظيفة معينة مستهدفة والجين المقابل أو الجينات المقابلة تم التعبير عنها فى نظم حية أخرى للحصول على النتيجة المرجوة .

لقد قام علماء تكنولوجيا " الدنا " النباتية DNA plant technology (DNAP) بغرس أو إدخال جين الكيتنيز الخاص بالسيرتيا مارسينس فى الدخان والبطاطس والخس وبنجر السكر . انزيم الكيتينيز يكسر الجدار الخلوى لخلية الفطر والنباتات المهندسة وراثيا تقاوم العدوى بفطر التربة الريزوكتونيا سولانى . بحاث DNAP قاموا بالتخليق الكيميائى لجين يشفر بروتين مضاد للتجمد شبيه بالموجود فى سمك الفلوندر الشتوى . لقد تم التعبير عن الجين فى نباتات الخضر والخميرة . هذه النباتات المهندسة وراثيا يمكن أن تتحمل

دورات الصقيع والتجمد بشكل أفضل دون فقد الطعم أو القوام . هذا البروتين المضاد للتجمد قد يضاف الى الآيس كريم واللبن المثلج كى يمنح القوام المحبب او تكوين بلورات الثلـــج . التتابع النيوكلتيدى المخلق يشفر البروتين البكتيرى أسـيتولاكتات سينسـيز والــذى يقــاوم السلفونيل يوريا والتراى أزولوريميدين سلفون أميد وكذلك مبيدات حشائش الايميدارزولينون والتى عبرت عن نفسها فى العديد من النباتات كي تؤدى الى الحصول على طرز مقاومـــة مقابلة .

التنوع الجزيئى : مكتبات جزيئية صغيرة لاكتشاف الدواء

Molecular Diversity : Small molecule libraries for drug discovery

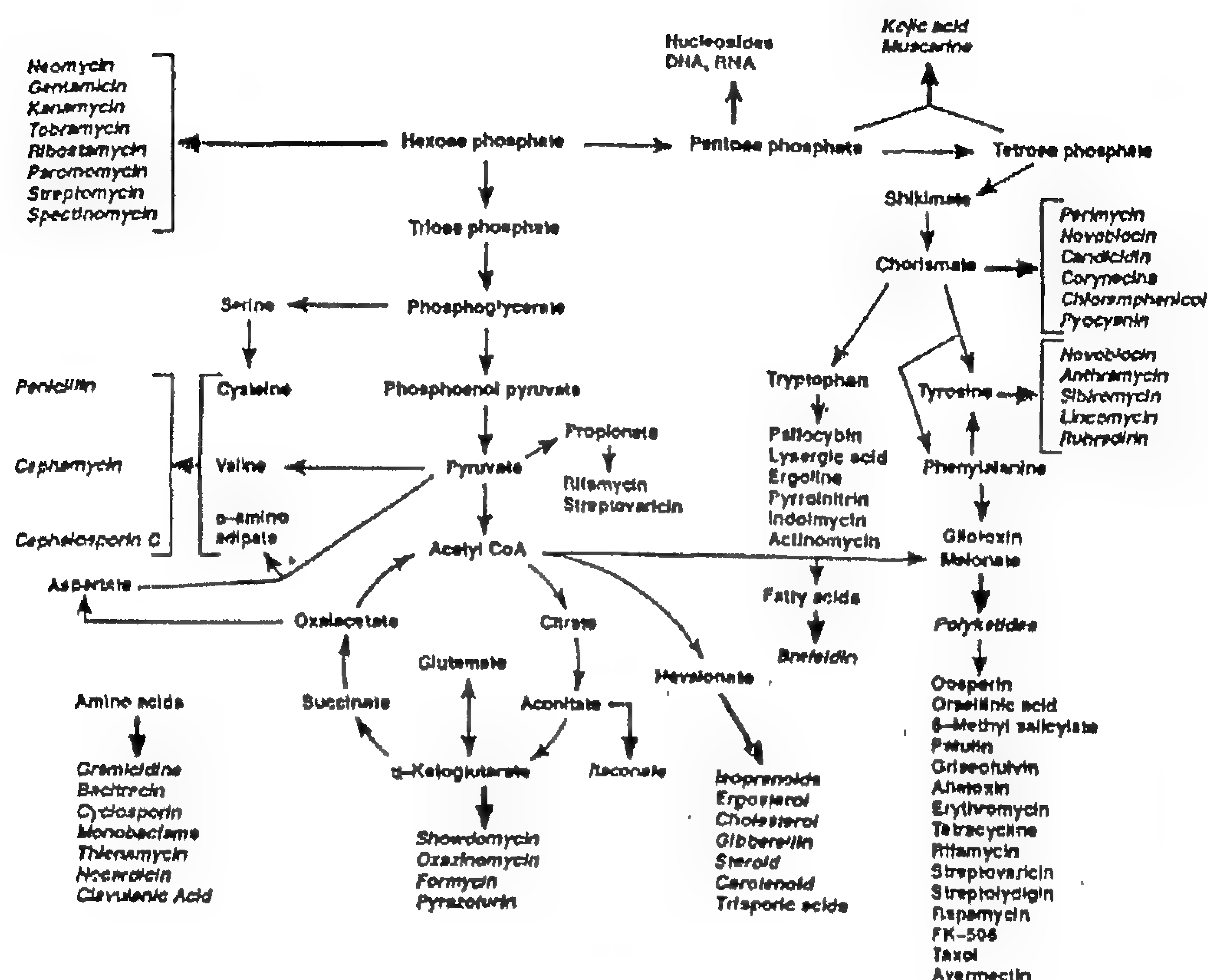
لقد أدى استخدام المكتبات المندمجة الى إحداث ثورة كبيرة فى سبيل اكتشاف الدواء (Kauvar ، ١٩٩٥ ، Olivera وآخرون ، ١٩٩٥) . لقد أدت هذه التكنولوجيا الى توفـير تنوع كبير من المركبات التى تدخل سلسلة الاختبارات لتعريف الجديد وعمل مشتقات مــن الأدوية المستخدمة فعلا . كيمياء الأوساط الصلبة استخدمت فعلا فى التخليق الآلى للببتيدات والنيوكلوتيدات (الأوليجونيوكليتيدات) . الاهتمام الحديث بالحصول على تنوع فى تخليــق المواد الصيدلانية التى بها جزيئات عضوية صغيرة أعادت شباب اتجاه الكيمياء العضويــة للأوساط الصلبة والحصول على الأجهزة المناسبة للكشف عنها .

تكنولوجيا استخدام الفاج قد تساهم فى طرق الفصل والتنقية بواسطة اختيار روابــط البروتين مع المقدرة الفائقة والتخصص العالى لأى موقع مستهدف . إن استخدام الإمكانيات الكروماتوجرافية فى عمليات التنقية الحيوية محدودة بسبب صعوبة إيجــاد روابــط عاليــة المقدرة ذات تكلفة مقبولة يمكنها أن تتحمل عمليات التنظيف والتعقيــم المطلوبــة بواســطة بروتوكولات صناعة المواد الصيدلانية . من أكثر الروابط مقدرة وشيوعا مثـــل الأجســام المضادة وحيدة الكلونة تلك التى لم تستخدم على نطاق واسع بسبب ارتفاع تكاليف إنتاجــها كما أنها لا تحقق فصل جيد للشوائب القريبة التركيب من الجزيئات المستهدفة وكذلك نقـص الثبات بما يسمح لها بتحمل بروتوكولات الحساسية القاسية .

الممثلات الثانوية : المرصاصات أو الوسائل السحرية للأطباء

Secondary metabolites : Magic bullets of the physiician

التخليق الميكروبى للصيدلانيات الكيميائية ذات النشاط الحيــوى ذات أهميــة فــى التخمر التقليدى وتكنولوجياته (الشكل ٨-١) . هذه الجزيئات ذات استخدامات واسعة فــى الطب البيطرى والزراعة وصحة الإنسان من خلال مضادات كل من الممرضات الفيروسية والبكتيرية والفطريات والكوكسيديا والبروتوزا والديدان والأورام وكذلك المبيــدات بجميــع أنواعها .



شكل (٨-١) : الممثلات الأولية كبادئات للممثلات الثانوية . الاسهم الثقيلة تشير الى قنـــوات الممثـــلات الأولية فى الممثلات الثانوية (مأخوذة عن Malik ، ١٩٨١)

معظم الجزئيات التى أنتجت ميكروبيا تم تحويرها كيميائيـــا لإنتـــاج مشـــتقات ذات صفات بيولوجية فائقة الكفاءة . فى هذا السبيل تم تجهيز العديد مـــن المشـــتقات الجديـــدة للإفرمكتينات ، ليفاستاتين ، البنســـلينات ، سيفالوسـبورينات ، الأمينـــو جليكوســـيدات ، كلورومفينكولات ... الخ . من خلال الطفرية التقليدية تم زيادة إنتاجية المضادات الحيويـــة للمستوى الذى جعل من إنتاجها مربحاً . البنسلينيات (٦٠ جم / لـــتر) ، سيفالوســـبورينات (٤٠ جم / لتر) ، ستربتومايسين (٤٠ جم / لـــتر) ، ارثرومايســـين (١٠ جـــم / لـــتر) ، تتراسيكلين (٣٠ جم / لتر) ، ريفامبين (١٠ جم / لتر) ، لينومايسين (١٠ جم / لتر) تنتـــج فى العديد من صناعات التخمر عند المستويات الموضحة .

تكنولوجيا " الدنا " المندمجة Recombinant DNA technology استخدمت لخلق وسائط للتحوير الجزيئى الكيميائى وتهجين الجزيئات ذات التراكيب الكيميائية المعقدة (Jacobsen وآخرون ، ١٩٧٧) . هذا قد يتحقق من خلال اندماج المسارات التى تخلق تنوع كيميائى وكذلك تراكيب متشابهة (Malik ، ١٩٨٢) . اندماج مسارات مختلف الماكروليدات الناتجة من الاستبربتومايسيز بدأت بالفعل وسوف تؤدى الى الحصول على مضادات حيوية مفيدة فى العلاج السريرى (ماليك ، ١٩٨٦) . الجين الخاص بانزيم الاكسبنديز من الكائن المنتج للسيفالوسبورين تم إدخاله فعلا فى منتج البنسلين بنسيليوم كريزوجينم . هذا يسمح بإنتاج تركيب حلقى ممتد مع سلاسل جانبية شبيه بالبنسلين . هذا المشتق المميز الجديد المخلق حيويا قد يتحلل مائيا بواسطة تكنولوجيات الانزيمات الموجودة لتخليق مواد وسيطة مشابهة للحامض ٧-أمينو سيفالوسبورانيك (7-ACA) . الخطوات الأخيرة المشتركة فى التخليق الحيوى للسيفالوسبورين قد توقف أو تعطل بواسطة إدخال شاطبات أو مزيلات الجينات المقابلة . هذا يؤدى الى اقتصادية المسار بينما ينتج منتج يتحول الى 7-ACA . العديد من الجينات التى تحور المضادات الحيوية الى مواد وسيطة للتخليق الكيميائى موجودة ومتوفرة (Lorenz and Weigel ، ١٩٧٧) . لقد قدم علماء البيوتكنولوجيا اليابانية فعلا انزيمات محللة فى بكتريا اكريمونيوم كريزوجينم لتخليق 7-ACA بواسطة التخمر (Isogai وآخرون ، ١٩٩١) . الجينات اللازمة للاستغلال الفعال لمصادر الصويا والكربون والنتروجين قد تزرع فى الكائنات الحية والتى عزلت أساساً من التربة . إن الحصول على السلالات الصناعية مع نسخ مكبرة من الجينات المطلوبة أصبحت ممكنة الآن (Haselkorn ، ١٩٧٧ ، Wach وآخرون ، ١٩٩٧ ، Mavingui وآخرون ، ١٩٩٧) . جيل السلالات التى تحفز قابلية نقل الممثلات بعيداً عن الخلية وتعطل فى إنتاج الحامض سوف تساهم لاحقا فى إنتاج محفز زائد من المضادات الحيوية .

هندسة البروتينات : تحسين الانتخاب الطبيعى Engineeriing proteins

لقد تم تحقيق استخدامات عديدة للانزيمات فى إنتاج المواد الغذائية والأحماض الأمينية والمنظفات وكيميائيات السيطرة على التلوث وتخليق الكيميائيات غير المتماثلة (جدول ٨-٦) . يعتقد البحاث أن الاستخدام العالمى للانزيمات سوف يزداد (Chaplin and Buke ، ١٩٩٠) . هذا بسبب أن الانزيمات عبارة عن منتجات جينات فردية وأن الطرق الحديثة فى تكنولوجيا "الدنا" المندمجة يمكن أن تستخدم لزيادة إنتاجيتها وتحوير خصائصها فى عوائل ميكروبية مناسبة . لكى نقلل تكاليف إنتاج واستخدام الانزيمات نلجأ الى تحسين السلالات البكتيرية وزيادة عدم حركية الانزيمات وثبات الخلايا (Taylor ،

١٩٩١) . الكريستلات أو البللورات الدقيقة للانزيمات النامية من محلول مائى والتى ترتبط عبوريا مع جوهر كشاف ثنائى الوظائف مثل الجلوتارالدهيد تحقق تحمل حركى عالى للحرارة المرتفعة بالقرب من المذيبات العضوية اللامائية (قطبى وغير قبطى) عنه فى حال الانزيمات الذائبة وغير المتحركة . الانزيمات فائقة الحب للحرارة تشتق من الكائنات الدقيقة النامية عند الحد الأعلى من مدى الحرارة الحيوية أظهرت ثبات جزيئى داخلى متناهى فى الارتفاع . لقد أظهرت دراسات فصل التراكيب العالية للبروتينات المتماثلة من الطرز الحيوية متنوعة الحرارة تقدم معلومات جيدة عن تقنيات الثبات الحرارى للبروتينات . هذه القواعد الخاصة بالتصميم ذات أهمية فى توجيه الصناعة نحو هندسة انزيمات صناعية ثابتة . تستخدم معقدات الانزيمات بواسطة الخلايا لتحقيق أهداف معقدة مع كفاءة وثقة عالية . معقد الانزيمات الصناعى قد يستخدم لتحقيق نفس الهدف . معظم الانزيمات التجارية فى الوقت الحالى تشمل انزيمات التحلل المائى (هيدروليسيز) مثل البروتييزيس والكربوهيدروليسيز كما أن استخدامات الانزيمات من هذا النوع سوف يستمر فى الزيادة . هناك مجموعات أخرى من الانزيمات (ترانسفيريزيس ، أوكسيدو – ريداكتيزيس) تستخدم فى الصناعات الغذائية والصحة العامة لإنتاج سكريات جديدة وأحماض عضوية وأحماض أمينية . فى السنوات الأخيرة استفادت صناعات النسيج بشكل كبير من استخدام انزيمات السليلازيس فى عمليات التنتييل والخيوط . الفوائد التى ارتبطت بالسلليوليزيس شملت احلال الأحجار فى عملية الغسيل بالحجارة وتطرية السطح اللامع للأقمشة وإزالة العيوب من القماش . هناك فوائد إضافية تمثلت فى ملائمة نظام السلليوليز متعدد المكونات . انزيمات نافعة بالإشارة الى الثبات والأداء لاستخدامات صناعية متخصصة تعتبر الهدف الرئيسى لهندسة البروتينات من خلال التصنيع الحيوى . إن الطفرة الخاصة بانزيم البيروكسيديز من كوبرينس سينيريس فى موضع مفرد من الحمض الأمينى أحدثت تحسن معنوى فى الثبات تحت ظروف الحموضة والحرارة العالية ومازالت الاستخدامات الصناعية تتوالى .

السباق نحو تحسين الإنتاجية والجودة مع تقليل التكاليف وضعت ومازالت تضع ضغوط متزايدة على رجالات البحث الصناعى لتحقيق الحصول على انزيمات صناعية ذات استخدامات فعالة جديدة بتكاليف معقولة . الاستخدامات ذات المردودات البيئية للانزيمات فى مجالات مثل التصنيع الغذائى والكيميائيات النقية الدقيقة والخاصة والمواد الصيدلانية والمنسوجات ولب الخشب والورق والمنظفات خلقت طلبات محددة للتكنولوجيات الجديدة . الان يقوم العلماء بإيجاد انزيمات محورة ذات صفات تتفوق على الانزيمات الطبيعية . هذه الانزيمات المحورة وراثيا تخلق بثلاثة طرق :

١-التضاعف الوراثى للكائن لانتخاب قرائن للانزيمات الطبيعية .

٢-الطفرية الخارجية للجين والتعبير عنه فى عائل مناسب .

٣-إنتاج انزيم جديد تماما من خلال خلق جسم مضاد مساعد .

تحتاج كيمياء البروتين لفهم جيد قبل تحسين أداءها (Schimmel ، ١٩٩٠) . الهدف على المدى الطويل يتمثل فى التصميم العقلانى للانزيمات الفعالة والحيوية النشاط. تبنى هندسة البروتينات على الهندسة الوراثية والبللورية بأشعة أكس والتحوير فى تركيب البروتين والتخليق والتحليل والاستنتاجات والترقية والتنقية . توجد شركات كبيرة ذات مشروعات عملاقة لتحقيق هذه الأهداف مثل مونسانتو ، ديبونت ، معامل مايلز ، ايتمان كوداك ، هوفمان لاروش ، أبجون ، جينينيك ، ريبليجين ، سيتاس وأمجين . التصميم العقلانى لمثبطات HIV بروتينيز الأساس للببتيد باستخدام التراكيب ثلاثية الأبعاد للانزيم تم تحقيقه فعلا (Roberts ، وآخرون ، ١٩٩٠) وقد ثبت أنه دواء يعالج مرضى فقد المناعة الأيدز .

الطفرية من جهة الموقع تمكن من الاحلال الدقيق للحمض الأمينى فى أى مكان من تركيب البروتين (Landt وآخرون ، ١٩٩٠) . لقد قدمت هذه التغيرات فى البداية على مستوى النيوكلوتيد فى التتابع المشفر حيث يدخل ويغمس الجين المحور من عائل مناسب لتعبير البروتين ويتم عزل البروتين المحور . البروتينات التى تم تقدير التراكيب ثلاثية الأبعاد بأشعة إكس تعتبر مواد جيدة للتحويرات الوراثية ولو أن محاولات جعل التغيرات فى الأحماض الأمينية ذات معنى مازالت تتطلب جهد كبير وعمل مضنى .

البروتين الذى يهضم بالأنزيم "Subtilisin" يستخدم تجاريا فى منظفات الغسيل حيث يتعرض للكلورين ومواد التأكسد ودرجات حموضة متناهية . لقد قام العلماء فى جينيكور وجينيتيك بتجهيز ما يزيد عن ٨٠ طفرة من السوبتيليسينات . لقد لاحظ البحاث أن إحلال الميثونين عند الموقع ٢٢٢ مع أكسدة أكثر وأحماض أمينية مقاومة (الانين ، سيرين أو ثريونين) تثبت الانزيم ولكنها تقلل من نشاطه . لقد قامت شركة Novo Nordisk بهندسة البروتييز المقاوم للتبييض " دورازيم Durazym " حيث تم إحلال الميثونين باحماض أمينية أخرى . لقد قامت هذه الشركة بتصميم انزيمات إضافية لأغراض متفاوتة . استخدام انزيمات أخرى (مثل البروتييز القلوى الثابت فى الحرارة ، أميليزيس ، ليبيزيس) فى تنظيف الأطباق فى الغسالات الأوتوماتيكية بشكل متزايد بسبب طلب الحصول على منتجات آمنة .

على نفس المنهاج تم تقديم مخلفات السيستين لتكوين روابط عبورية جديدة للداى سلفيد فى لليزوزيمات . هذه العبورات الداخلية تم إدخالها بهدف حماية الانزيم من التقطيع المحفز لفقد النشاط بدون تحطيم وظيفة التحفيز والمساعدة . لقد تم إحلال مثيونين خاص حساس للأكسدة بالثالين فى α_1 – أنيكتربسين بواسطة علماء شركة Chiron هذا الانزيم المهندس وراثيا يعطى ويحقق حماية للرئتان ضد الأكسدة وفعل الانزيم إيلاستين . يمكن التمييز المعدنى وتصميمه فى البروتينات كى تستخدم فى تنقية البروتينات (Arnold and Hapmore ، ١٩٩١) . من الأمثلة الأخرى لهندسة الانزيمات تبديل تخصصية التربسين من الأحماض الأمينية الارجنين والليسين الى الليسين فقط . لقد تم احلال مخلفات السرين الهامة فى الموقع النشط للالكالين فوسفاتيز بالسيستين دون فقد التحفيز . أفضلية الوسيط زيلوز أيزوميريز المحبة للحرارة الى د- زيلوز ، د-جلوكوز (Meng وآخرون ، ١٩٩١) . لقد تم تشفير الباسيلليس ستيروثرموفيلليس لكتات ديهيدروجينيز الى المالات ديهيدروجينيز النشط والانزيم واسع النشاط هيدروكسى آسيد ديهيدروجينيز لتخليق المواد الوسيطة الهندسية للاستخدامات الصيدلانية لقد وجد الكيموسين وهو أسبارتيك بروتينيز فى المعدة الرابعة للعجل الصغير غير المفطوم وتم طفرته للحصول على تغير مناسب فى رقم الحموضة وتخصص للوسيط (Pitts وآخرون ، ١٩٩١) . إن هندسة اللاكتوكوكال بروتينيز المتخصص للاستخدام فى صناعة الجبن أصبح من الأهداف الواضحة (Kok ، ١٩٩١) . البروتينات ذات القيمة التجارية سوف تتعرض للهندسة فى المستقبل القريب لخلق جيل ثانى من المنتجات . الهورمونات ومحورات الاستجابة البيولوجية قد تكون ذات مكون هام من هذه المنتجات الجديدة . الانسولينات فائقة النشاط من صنع الإنسان (Morihara and Veno ، ١٩٩١) . والطفرات الخاصة بالمستقبل لهورمون النمو فى الإنسان (Cunningham and Wells ، ١٩٩١) تم إنتاجها . إحلال عامل البصمة والنمو السائد فى منشط البلازمونوجين النسيجى بالبلازمونوجين كرينجل I تم الإشارة إليه. لقد أصبح فى الإمكان الان عمل تصميم مبنى على التركيب وهندسة روابط الداى سلفيد الداخلية فى تروفينات الغدد وكذلك زيادة وتحفيز الثبات (Heikoop وآخرون ، ١٩٩٧ ، Campayo وآخرون ، ١٩٩٧) .

الانهيار بالميكروبات ومكافحة التلوث : أحد الفرص المتاحة

Bioremediation and Pollution Control : An opportunity

التراكيب الكيميائية من صنع الإنسان (المواد الغريبة Xenobiotics) والتى لم تتعرض لها الميكروبات خلال النشوء والارتقاء فى العادة تقاوم الانهيار الحيوى . هذه

الجزيئات يمكن أن تبقى فى البيئة لمدد طويلة دون أية تغيرات . من جهة أخرى فان المجتمعات المنشطة من الكائنات الدقيقة يمكن أن تهيىء لتمثيل هذه الملوثات . فى البداية يمكن أن تنتخب الكائنات الحية التى تحور الجزىء من خلال التحول الفراغى الكيميائى الى وسيط منفرد ولكن مع عدم استخدامه كمصدر للكربون . لذلك يمكن دمج العديد من التفاعلات المحددة فى كائن حى واحد يستطيع أن يداوم ويعيش جيدا فى البيئة التى ظهر فيها الملوث . لقد دونت وكالة حماية البيئة الأمريكية USEPA قائمة لأولويات الملوثات شملت المبيدات والمركبات الاليفاتية الهالوجينية والمركبات العطرية والمواد العطرية النتروجينية والعطرية الأروماتية والبولى كلورينتيد بيفينيل والنفثالات إسترات والايدروكربونات الأروماتية العديدة الحلقات والنيتروسامينات . لقد قدر حجم سوق الانهيار الحيوى للمخلفات الضارة بحوالى ٢-٣ مليار دولار أمريكى كل سنة (Peyton، ١٩٨٥) الفرص متاحة وموجودة لإيجاد كائنات حية مهندسة وراثيا للإسراع بالانهيار الحيوى والإسهام فى نشر مخلفات المواد السامة التى تعتبر مثل القنبلة الموقوتة .

قد يصبح فى الإمكان إذابة أكاسيد اليورانيوم النشطة إشعاعيا فى المخلفات النووية قليلة المستوى ومن ثم تغيير تكافؤ المركبات المحتوية على اليورانيوم . هذا قد يسبب ترسيبها فى صورة غير متحركة وغير إشعاعية . لقد أوضح علماء شركة كالجين أن الميكروبات التى فيها بنزوات ديوكسى جينيز ، ٢,١-ديهيدرو داى هيدروكسى بنزوات ديهيدروجينيز ، كاتيكول ٢.١- اكسجينيز لا تنمو على البنزوات أو المونوهالوبنزوات ويمكن أن تتراكم حامض موكونيك من المواد الوسيطة العطرية المختارة (5,026,648us patent) . هذه الاستراتيجيات قد تستخدم لتحويل الملوثات السامة الى مواد وسيطة مفيدة للتمثيل .

الكائنات الحية : مضادات لإنتاج البروتينات الغريبة

Living organisms: Factories for producing foreign proteins

تكنولوجيا " الدنا " المندمجة Recombinant DNA تسمح بعزل الحامض النووى cDNAs المسئولة عن تخليق البروتينات الهامة التى توجد فى جسم الإنسان بكميات صغيرة للغاية فقط (Darnell وآخرون ، ١٩٩١) . لقد تم التعبير عن cDNAs فى أنواع مختلفة من الخلايا للإنتاج الكبير لمنتجاتها البروتينية على نطاق تجارى (جدول ٨ -٧) . الانسيولين الآدمى وهورمون النمو الإنسانى تم إنتاجها فعلا فى بكتريا E.coli وهى تباع الآن فى الأسواق بواسطة شركة جينتيك Genetech . لقد قامت شركة أمجين بإنتاج عامل التنشيط فى مستعمرة مندمجة للخلايا الحبيبية (rG – CSF) لمحاربة العدوى

المرتبطة ببعض الأدوية العلاجية المضادة للسرطان . منشط النسيج بلازمينوجين الذى ينتج بواسطة زرع الجين البشرى فى البكتريا يعتبر منتج تجارى يحقق ٣٠٠ مليون دولار . لقد تم قبول الجاما انيترفيرون فى إنتاج شركة الجينيتيك لمعالجة المرض المزمن فى الدم granulomatous وهو مرض خلل وراثى فى نظام المناعة والتى تؤدى الى عدوى خطيرة طوال حياة الإنسان . يتم بيع الارثروبوتين بواسطة شركة Amgen لزيادة إنتاج خلايا الدم الحمراء وعلاج فقر الدم " الانيميا " . العديد من الفيرونات الداخلية والليمفوكينات التى تنتج بواسطة الوسائل الميكروبية متوفرة فى الأسواق والعديد منها مازال تحت الاختبار المعملى للتأكد من فاعليتها .

بمجرد عزل الجين يجب إنتاج البروتين الخاص به وتوصيفه . إختيار العائل للتعبير عن الجين الغريب فى الغالب يعتمد على الغرض الأولى فى عزل الجين (Zaworski وآخرون ، ١٩٨٩) . بالرغم من أن خلايا العائل البكتيرى يمكن استخدامها للتعبير عالى المستوى للجينات المزروعة فأنها لا تملك المقدرة أو القابلية للتحوير الصحيح لبعض أنواع الكائنات الدنيئة ومثال ذلك جليكوسللة الجليكوبروتينات . بالإضافة الى ذلك فان بعض الجينات الغريبة التى يعبر عنها فى البكتريا تتراكم فى الغالب كأجسام متجمعة وتحلله والتى تتطلب محاليل عالية التركيزات من اليوريا أو الجوانيدين لإذابتها (Seetharam and Sharma ، ١٩٩١) . فى العديد من الحالات فان مكون واحد فقط من البروتين المعبر عنه يمكن أن يتحلل فى صورة كاملة النشاط . خلايا العائل الدنىء التى تنمو فى مزارع الأنسجة تحل هذه المشاكل ولكنها توجد مجموعة جديدة من المعوقين . العديد من هذه العوائل تتطلب إضافة سيرم فى وسط النمو الخاص بها والتركيز العالي من بروتينات السيرم غير المطلوبة قد تعقد عمليات التنقية . يوجد الآن فى الأسواق تجاريا جيل جديد من الوسط خالى من السيرم لتسهيل عزل البروتينات المندمجة التى يعبر عنها فى الخلايا الدنيئة.

إن تطور طرق الحقن الدقيق للحامض النووى "الدنا" فتح آفاقا واسعة لهندسة الحيوانات التى تحمل جينات غريبة وتكاثرها لإنتاج النسل الخاص بها (Wagner ، ١٩٩٠) . فى هذا السبيل يمكن دراسة التعبير الجينى فى داخل الخلايا in vivo . مثال ذلك هورمون النمو الادمى والذى أمكن زرعه بنجاح فى الفئران والأرانب والأغنام والخنازير (Jaenisch ، ١٩٨٨) على أمل أن يأتى اليوم الذى يمكن فيه تحقيق العلاج الوراثي للتقزم فى الإنسان dwarfism . الأبقار المهندسة وراثيا التى تحمل البوفين سوماتوتروفين زادت من إنتاج اللبن بمقدار ١٠ – ٢٥% بالرغم من أن الفوائد الاجتماعية لهذا التأثير مازالت محل جدل ومناقشة (Potera ، ١٩٩٠) . لقد قامت مؤسسة , Princeton , N.J.

DNAX بإنتاج خنازير مهندسة وراثيا يمكنها تخليق هيموجلوبين الإنسان . هناك حيوانات أخرى مهندسة وراثيا تحمل الجينات الآدمية يمكنها أن تقدم مصدر مستمر للبروتينات العلاجية المندمجة فى المستقبل .

لقد أمكن تحقيق تعبير خاص فى الأنسجة للعديد من البروتينات العلاجية فى أبقار إنتاج اللبن من أجل الحصول على حجم إنتاج عالى . هذا التقدم التكنولوجى قد يسمح بالإنتاج الرخيص للبروتينات الغريبة والتى لا يمكن تحقيقها من خلال نظم التعبير التقليدية . لقد كان البحاث فى معهد فسيولوجيا الحيوان وبحوث الوراثة فى إدنبرج باسكتلندا أول من نجح فى إنتاج الأغنام المهندسة وراثيا التى تنتج فى ألبانها مستويات قليلة من عامل X1 المضاد للدم antihemophilic وكذلك $\alpha 1$ الانتيتربسين الآدمى . فى الحالة الأخيرة يتم إفراز حوالى ٣٥ جرام من $\alpha 1$ أنتيتربسين البشرى لكل لتر لبن . لقد نجح علماء شركة ماسوشيتس فى مؤسسة جينزيم وعلماء جامعة تفتس Tufts فى إنتاج ماعز مهندس وراثيا لإفراز منشط البلازمونوجين فى الأنسجة فى ألبانها . تعمل لشركة سين فارم الدولية على إنتاج لبن أبقار به بروتين لبن بشرى مع مضادات البكتريا وصفات نقل الحديد فى الرضع . البروتينات التى يصعب إنتاجها بوسائل أخرى يمكن إنتاجها عن هذا الطريق .

هندسة الفاكسينات والأجسام المضادة

Engineering vaccines and Antibodies : An Odyssey .

على خلاف الفاكسينات عديدة التكافؤ التقليدية فان الفاكسينات المهندسة وراثيا تحتوى على واحد فقط أو قليل من الانيتجينات الكبرى للعامل المرضى ذات المقدرة على إنتاج الاستجابة المناعية المتعادلة عند العدوى (Lillehoi and Malik ، ١٩٩١) . هذه تحت وحدات الفاكسين قد لا تكون فعالة كتلك التى جهزت من الكائن الحى الكامل ولكنه بوجه عام أكثر ثباتا وأمانا فى الاستخدام . الأمراض التى تؤثر على نسبة كبيرة من سكان العالم حظت بأولوية كبرى فى إنتاج الفاكسينات المندمجة . مثال ذلك أنه فى الصيف يتعرض أكثر من ٨٥% من السكان للإصابة بمرض التهاب الكبد الوبائى بالفيروس B. لقد تم كلونة الجين ليضاد الانتيجين السطحى Hbs Ag للفيروس B وعندما تم التعبير عنه فى الخميرة واستخدم كجين مناعى خلق استجابة مناعية واقية . الأمراض البشرية مثل الحصبة وشلل الأطفال والسل الرئوى والجذام والملاريا قد يأتى اليوم الذى تكافح فيه أو تستأصل بواسطة الفاكسينات المهندسة وراثيا (Xiong وآخرون ، ١٩٩٧) .

الدور والكفاءة الكبيرة للأجسام المضادة وحيدة الكلونة للـ murine فى التشخيص والعلاج محدود فى الإنسان بسبب المناعة المرتبطة بالنوع . لقد استخدمت اقترابات الهندسة

الوراثية لجعل هذه الأجسام المضادة أكثر بشرية من خلال إحلال مناطق الانتيجين المندمجة فى الفئران (VH , VL) بالمناطق العالية والخفيفة الثبات فى الإنسان . مثل هذه الجزيئات من الأجسام المضادة ليست أقل مناعة فى الإنسان فقط ولكنها تمسك الانيتجين المتخصص للجسم المضاد وحيد الكلونة الأصلى (Moss ، ١٩٩١ ، Waldmann ، ١٩٩١) . من الاقترابات الأخرى تلك التى مكنت من استخدام شرائح الجسم المضاد الذى يحتفظ بصفات الانتيجين المرتبط . شرائح الأجسام المضادة وحيدة الكلونة F (ab')2 , Fab , Fv قللت المناعة . لكن الكفاءة العظمى لهذه الشرائح المضادة تكمن فى مقدرتها على اختراق الأنسجة أفضل من جزيئات الأجسام المضادة السليمة . لهذا السبب تكون شرائح الجسم المضاد أكثر فاعلية كمواد للتشخيص ذات أهمية تطبيقية مثل الصور الإشعاعية حيث أن النظائر المشعة تتحول وترتبط معهم . هذه تعتبر جزيئات علاجية للمناعة فعالة عندما ترتبط بالنظائر المشعة والتوكسينات الطبيعية أو الأدوية السامة للخلايا المخلقة . يحدونا الأمل أن يجىء اليوم أن نحصل ونستخدم أدنى تتابع للحمض الأمينى قادر عند ارتباطه الشخصى بالانتيجين لتحقيق الأهداف المنشودة . الأجسام المضادة وحيدة السلسلة تتكون من مناطق VH , VL مرتبطة بالتكافؤ بواسطة رابط ببتيدى وقد ثبت أنها تملك نفس صفات ارتباط الانيتجين كما فى الجسم المضاد الذى أشتقت منه (Bird وآخرون ، ١٩٨٨ ، Fluston ، ١٩٨٨) . فى الاتجاه الآخر تماما نجد أن الببتيدات المخلقة القصيرة ذات التتابع الذى يحاكى موقع الانتيجين المرتبط بالأجسام المضادة سوف تجد طريقها للاستخدامات السريرية (Williams ، ١٩٨٩) .

المبيدات الحيوية : بدائل للملوثات البيئية

Biopesticides : Alternatives to Environmental pollutants

لقد تمت الموافقة وقبول المبيدات المهندسة وراثيا من إنتاج شركة Mycogen (MVP , M- Trok) بواسطة وكالة حماية البيئة الأمريكية (EPA) كى تباع فى الأسواق الأمريكية . لإنتاج هذه المبيدات الحيوية قامت الشركة بإدخال جين البروتين القاتل كمبيد حشرى من بكتريا الباسيلليس ثورينجينسيز فى البسيدوموناس (US patent 5002,765). لقد تم تخمير البكتريا المندمجة ثم قتلت كى تستخدم على المحاصيل . هذه الخلايا المقتولة تغلف بروتين المبيد تعتبر غذاء قاتل للحشرات الآكلة للأوراق والتى تهاجم نباتات الكرنب والخس والبروكلى وغيرها من الخضراوات وضد خنفساء الكلورادو التى تتلف البطاطس والطماطم والباذنجان . لقد قام علماء شركة مونسانتو بالتعبير عن جين Bt السام فى الكائنات الحية التى تستعمر جذور النباتات . لقد أمكن الحصول على العديد من النباتات

التي تتحمل مختلف الحشرات والآفات (Kumar ، وآخرون ، ١٩٩٦) . الهندسة الوراثية للحشرات لمكافحة آفات المحاصيل تقدم إمكانيات لا حدود لها (Estruch وآخرون ، ١٩٩٧) .

التكنولوجيا النباتية : انتصار للهندسة الوراثية

Plant biotechnology : Triumph of Genetic Engineering

الهندسة الوراثية للنباتات تعتبر الثورة الخضراء القادمة . هذه التكنولوجيا تسمح بالتعبير عن الجينات الراسخة في كل أنواع النباتات . هذه البيولوجيا الجديدة تقدم وسائل قوية لتعضيد وتسهيل برامج تربية النباتات التقليدية . الأصناف النباتية ذات الصفات الزراعية الجيدة والمرغوبة يمكن تحسينه لتحقيق تصنيع أفضل جودة المحتوى الصلب وكميته والطعم واللون والقوام والحموضة والحلاوة والحجم والشكل في الأجزاء التي تؤكل طازجة . الصفات الأخرى التي يمكن تحويرها وتحسينها تشمل القابلية للحصاد الآلي والتخزين والمقاومة للأمراض والآفات والحشرات والصقيع . التحوير الوراثي للنباتات يقدم إمكانية إنتاج العديد من الكيميائيات الخاصة والمواد الصيدلانية في النباتات . العديد من نباتات ذات الفلقة الواحدة وذات الفلقتان تعدل للأحسن بطرق الدنا المندمجة (Joshi وآخرون ، ١٩٩٠ ، Chrispeels and Sadova ، ١٩٩٤) . البذور المهندسة وراثيا لفول الصويا والقطن والذرة والشلجم والطماطم والكوسة والبطاطس أصبحت تباع الآن على نطاق تجاري والعديد في الطريق . في الجانب الآخر فان بعض الصفات البسيطة وحيدة الجين التي لا تتفاعل مع فسيولوجيا النبات في طريق معقد أمكن تحويرها . هذه الصفات مرغوبة من الناحية التجارية .

الهندسة الوراثية لتحقيق صفة التحمل لمبيدات الحشائش أمكن تحقيقها من خلال :

١-تغيير مستوى وحساسية الانزيم المستهدف لمبيد الحشائش في النبات .

٢-إدخال الجين الذي يحلل ويفقد سمية مبيد الحشائش .

لقد تمكن علماء شركة مونسانتو من الحصول على نباتات فول الصويا والقطن والذرة مقاومة لمبيد الجليفوسات (رواند – أب) بالتعبير عن الانزيم المتحمل للجليفوسات : ٥- انيول بيروفيل شيكيمات –٥– فوسفات (EPSP) سينسيز لبكتريا من نوع الأجروباكتيريوم ، وكذلك الانزيم المؤكسد للجليفوسات اكروموباكتر في نفس النبات . في هذه النباتات فان التخليق الحيوي للأحماض الأمينية العطرية لا تثبط والجليفوسات يتم تمثيله. لقد تمكن علماء ديبونت من التعبير عن طفرة جينات أسيتولاكتات سنسيز (ALS)

لإنتاج نباتات القطن التى تتحمل السلفونيل يوريا . جينات البكتريا التى تحدث أستلة أو تحلل مائى للجلوفوسينات والبروموكسينيل ثم إدخالها للحصول على أصناف مقاومة كذلك . التعبير عن جيل بروتين مكافحة الحشرات للباسيلليس ثورنجينسيز فى البطاطس والذرة والقطن وغيرها من النباتات المتعددة جعلتها مقاومة للعديد من الآفات الحشرية . السلالات المختلفة من البكتريا تنتج توكسينات ذات نشاطات مختلفة كمبيدات حشرية . نباتات الدخان هندست وراثيا للتعبير عن مثبط بروتينيز البسلة ذات المقاومة الجزئية لدودة براعم الدخان وقد يثبت فى المستقبل أهمية وفائدة هذا الاقتراب فى مكافحة الحشرات . النباتات المتحولة من خلال جينان مختلفان للمقاومة سوف تؤخر ظهور مجاميع الآفات المقاومة . ثاقبات ينجر السكر وسوسة بذور المانجو وغيرها من الآفات قد تكافح من خلال هذه الاستراتيجية.

لقد تم إنتاج العديد من النباتات المقاومة للعدوى بالفيروس من خلال التعبير عن مختلف الجينات للفيروس المقابل . النباتات التى تقاوم الأمراض البكتيرية والفطرية أصبحت متاحة . هذا الاقتراب للحصول على نباتات مقاومة للأمراض والفيروسات تمثل إمكانيات مطلوبة بإلحاح للزراعة فى دول العالم الثالث حيث يمثل التلف من جراء الإصابات الوبائية للآفات جزءا كبيرا وخطيرا يعوق تحقيق الأمن الغذائى (Gadvani ، ١٩٩٠) . لقد اضطلع البحاث Fuente وآخرون (١٩٩٧) بالخطوة الأولى فى اتجاه جعل النباتات مقاومة للالومنيوم . لقد قدموا جين السترات سينسيز للبيسدوموناس أيروجينوزا فى الدخان والبابايا . النباتات المتحولة تفرز السترات من جذورها التى تربط الالومنيوم مخلبيا. الزيادة فى إنتاجية المحاصيل قد تكون ممكنة مع ميزة حماية البيئة . لقد قام علماء شركة Zeneca بتقييم الجين الذى يخفض انزيم سيناميل الكحول ديهيدروجينيز فى النباتات . هذا قد يسمح بتسهيل إزالة اللجنين من السليلوز فى أشجار لب الورق كما فى الكافور . يمكن أن تستخدم النباتات كذلك لإنتاج الانزيمات لصناعات أعلاف الماشية والغذاء والتصنيع الغذائى كما فى حالة الفيتيز .

مواد الطعم والعطور : روائح طبيعية

Flavors and Fragrances : Nature's scents

صناعة مكسبات الطعم ومواد العطور قد تستخدم مكسبات طعم عالية الجودة من النباتات . لقد استخدم التفاوت فى السوموكلونال لإنتاج أصناف دخان ذات مستويات عالية من الرائحة العطرية والاسكلاريول (US Patent 5,012,040) . لقد استخدمت الاسكلاريول والابيانول لتحفيز الأمبروكس وهو عطر أو رائحة مطلوبة فى العديد من

المنتجات (Farbood ، ١٩٩١) بوصف التجهيز الميكروبى للفانيلين من الايوجينول والآيزوايوجينول . الآن أصبح متوفر فى الأسواق كيميائيات عطرية تنتج حيويا مثل الالدهيدات والكيتونات (أسيتالدهيد ، داى أستيل) والأحماض (الخليك ، البيوتيريك ، الكابرويك ، الكابريليك ، الأيزوبيوتيريك ، الأيزوفاليريك ، ٠,٢ ميثيل بيوتيريك) والاسترات (ايثيل وبيوتيل أسيتات ، ايثيل بيوتيرات ، كابروات ، أيزوبيوترات ، أيزوفاليرات ، ٠,٢ ميثيل بيوتيرات ، مينثيل أسيتات) واللاكتونات (جاما – ديكالاكتون).

الانزيمات المعزولة أو الخلايا الكاملة يمكن أن تحول البادئات الى كيميائيات عطرية ذات قيمة . من الأمثلة فى هذا الاتجاه إنتاج النوتكاتون فى وجود مزارع خلايا الموالح واختزال السيترونيلال الى سيترونيللول بواسطة بعض أنواع الخميرة وكذلك الهيدروكسلة الفطرية للباتكويلول ، والسيسدكواتيتربين فى الزيت الضرورى للباتكولى الى ١٠- هيدروكسى باتكولول متبوعا بالأكسدة الكيميائية / وفقد الكربوكسلة الى المركب العطرى نورباتكولوينول ، وكذلك الأكسدة الميكروبية لمركب ١- كارفون وهو مركب مكسب طعم مثل النعناع يبدأ بالالفا أو البيتا – بينين . الأحماض ثنائية القواعد ذات السلسلة الطويلة الالفا / أوميجا والتى تستخدم فى تخليق الأقنعة الحلقية الكبيرة موجودة الآن على المستوى التجارى . تقوم بكتريا ستربتوكوكس داى أسيتيل اكتس بإنتاج داى أسيتيل (٣,٢ – بيوتان ديون) وهو مكون مكسب طعم لمنتجات الألبان المزروعة . تقوم الياروويا ليبوليتكا بالتحليل المائى ثم تؤكسد زيت الخروع الى صورة حامض جاما – هيدروكسى الكانويك. الأخير يحدث له لاكتونية الى جاما – ديكالاكتون مع رائحة عطرية تشبه رائحة ثمار الخوخ .

لقد أصبح معروفا دور اللاكتوكوكال ببتيديز فى إنتاج ببتيدات الطعم خلال صناعة الجبن (Mulholland ، ١٩٩١) . قد أعلن مسئولى شركة Novo – Nordisk فى الدانمارك وهى الموردة للانزيمات الصناعية أن الجيرانيل أسيتات الطبيعية ذات النقاوة العالية تنتج بواسطة الاسترة المحفزة للجيرانيول الطبيعى وحمض الخليك باستخدام الليبيسيز المتخصصة . الاسترازات الميكروبية تقوم بالتحليل المائى الاختيارى للـ L-isomer فى المخلوط الراسيمى D,L -ميثيل أسيتات بما يسمح بفصل L- مثيانول من المخلوط الراسيمى المخلق . تقوم بكتيرا كورينيا باكتيريوم جلوتاميكم ٣ جم / لتر من التترامثييل بيرازين فى تخمر حامض الجلوتاميك . البيرازينات عبارة عن مركبات عطرية قوية توجد طبيعيا فى الغذاء بسبب تكوين اللون البنى أو التسخين . التكنولوجيا الحيوية ستقدم توسع فى فرص إنتاج مكسبات الطعم والروائح والتى يصعب تخليقها كيميائيا (Moyler ، ١٩٩١) . مكسبات طعم الشيكولاتة الثاوماتين والمونيلين يمكن أن تنتج فى الخميرة

(Kondo وآخرون ، ١٩٩٧) . هذا معناه أن كل الروائح والألوان ومكسبات الطعم يمكن الحصول عليها بطريقة سهلة وحيوية .

المزارع المائية : الموجة التالية Aquaculture : The next wave

تقدم المحيطات مصادر وفيرة للبحث والتطوير ولو أنه حتى الآن فان دور وكفاءة هذا المصدر السائد كأساس للتكنولوجيات الحيوية الجديدة ستبقى غير مستغلة . فى الحقيقة فان الغالبية العظمى من الكائنات البحرية الدقيقة مازالت فى حاجة للتعريف . حتى مع الأحياء المعروفة لا توجد معلومات كافية تسمح بالاستغلال التجارى . أحياء المحيطات تحتل الجزء الأكبر من المصادر البيولوجية على سطح الكرة الأرضية وفى الغالب تملك صفات متميزة وتراكيب مميزة ومسارات تمثيل ونظم تكاثر وتقنيات حسية ودفاعية أكثر تقدما . لقد تكيفت هذه الأحياء للعيش والبقاء فى بيئات متباينة التباين تتراوح من البحار القطبية الباردة على درجة حرارة -٢ م وحتى الضغوط العالية وحرارة سقف المحيط . مع التنوع الوراثي والفسيولوجي العريض فان الأحياء البحرية سوف تكون مصدر رئيسى لأقسام جديدة من الكيميائيات والعمليات التى تشمل الصيدلانيات والبوليمرات والانزيمات والفوكسينات ومواد التحليل والتشخيص .

المزارع المائية سوف تشمل زراعة الأحياء المائية بما فيها الأسماك والقواقع والقشريات والنباتات . العوامل الوراثية والغذائية والبيئية التى تتحكم فى إنتاج الممثلات الأولية والثانوية فى الأحياء البحرية تحتاج لمزيد من الدراسة . البيئات البحرية الاستوائية تأوى تنوع عريض من الحيوانات والنباتات . العديد من الأحياء البحرية عبارة عن مصادر ومن ثم يجب أن تستخدم طرق متقدمة للتنافس على مكان التواجد هذه الصفة ترجع الى التمثيل مع شركاء غير أرضية الكائنات الدقيقة وحيدة وعديدة الخلايا التى تماثل أو تميز عالم البحار تبدأ وتمثل مصدر كيميائى كبير . الطرق الخاصة بنقل الجينات ذات الاهتمام فى الكائنات الدقيقة غير البحرية يجب تطويرها . مثال ذلك المقدرة على إنتاج البولى سكريات البحرية وهو جزىء معقد ذات فائدة كمضاف للغذاء أو مادة لاصقة مضادة للماء يجب أن تنقل بسهولة للنبات أو لبكتريا سهلة النمو .

المواد العلاجية الطبيعية التى وجدت فى النباتات الأرضية والكائنات الدقيقة تستخدم كمصادر لأدوية جديدة . المنتجات البحرية الطبيعية قد تقدم قسم جديد وكبير من الأدوية . المركب مانوليد من الاسفنج الباسيفيكى كمثال يحتوى على أكثر من ٣٠٠ مشتق كيميائى تعمل كمواد مضادة للالتهابات . التطور السريع لطرق وتكنولوجيا التحليل السريع يمكن أن تسهل استغلال المركبات الجديدة ذات النشاط الحيوي . طرق التحليل هذه والتى تستخدم

مستقبلات متخصصة لمواد فسيولوجية معروفة تتطلب كميات قليلة من مادة الاختبار ويمكن أن تجرى آليا . الوسائل الجديدة تسمح بسرعة إجراء الاختبارات لمدى واسع من الأنشطة الحيوية . العمليات البيوكيميائية البحرية يمكن أن تستغل لإنتاج مواد حيوية جديدة . مثال ذلك المؤسسة الموجودة فى شيكاغو والتى تبيع تجاريا قسم جديد من البوليمرات القابلة للانهيار الحيوى منمذجة على مواد طبيعية تكون الأساس العضى لصفة القوقع . على نفس القدر من الإثارة التقنيات التى تستخدم بواسطة الدياتومات البحرية والكوكولثيوفوريدات والقواقع وغيرها من اللافقاريات البحرية لخلق تراكيب معدنية غير عادية على مقياس النانوميتر . إن فهم عملية تخليق هذه السيراميك الحيوى قد يحدث ثورة فى صناعة الوسائل الطبية وأجزاء المحركات والعربات والوسائل الالكترونية ومواد التغليف الواقية وغيرها من المنتجات الجديدة . الأحياء البحرية يمكن ان تقدم أساس تطوير المجسات الحيوية والمعلمات الحيوية ووسائل التشخيص للاستكشاف الطبى والبحرى والبيئى .

أحد أنواع المجسات الحيوية biosensor تستخدم الانزيمات المسئولة عن الإضاءة الحيوية . جينات Lux والتى تشفر هذه الانزيمات قد تمت كلونتها من البكتريا البحرية Vibrio fischeri وتم نقلها بنجاح الى أنواع من النباتات وبكتريا أخرى (Cubitt وآخرون ، ١٩٩٥) . جينات Lux كما هى تغرس ومن ثم تحدث وظيفتها فقط فى حالة تنشيطها بواسطة ظروف بيئية معروفة . الانزيمات المسئولة عن انهيار التولوين كمثال تخلق فقط فى وجود التولوين . عندما تزرع جينات Lux فى أوبيرون التولوين فان البكتريا المهندسة تتوهج بلون أخضر مصفر فى وجود التولوين . هذا النظام المهندس وراثيا "reports" يشير الى تقدم عمليات انهيار وتحطيم مواد كيميائية خاصة .

التكنولوجيا الحيوية تستطيع زيادة التكاثر وإحداث تطور مبكر فى الأحياء المائية المزروعة . الفوائد التى تتحقق تشمل إنتاج الجاميطات على مدار السنة والحصول على أنواع ذات قيمة اقتصادية وخلق أسواق جديدة للزريعة الخاصة المحسنة وراثيا . على نفس المنوال فان التكنولوجيا الحيوية تستطيع تقديم طرق لتحسين عملية التكاثر وزيادة النمو وخصائص تحول الغذاء وبقاء معيشة الأنواع الوشيكة الانقراض ومن ثم تحافظ على تنوع الحياة على سطح الكرة الأرضية . الأنماط الجديدة من التكنولوجيات ووسائل أخذ العينات وأجهزة القياس كلها سوف تساعد فى توفير المعلومات عن المصادر الاحيائية فى المحيط . هذه التكنولوجيات تشمل وسائل استكشاف الأعماق والأجهزة التى تدار بالاستشعار عن بعد والأقمار الصناعية وأجهزة إعادة الضغط للتوازن فى الأعماق عند أخذ العينات ونظم المعلوماتية الجغرافية ووسائل الكشف بتفاعل سلسلة البوليميريز (PCR) ووسائل الاستكشاف الحيوية وقاعدة معلومات وأى صور أخرى لتبادل المعلومات وتحليلها . هذه

الوسائل يجب أن تستغل للاسراع فى اكتشاف الكائنات الدقيقة البحرية غير المعروفة وتوسيع فهم عادات وخصائص الأنواع المعروفة .

التنوع البيولوجى فى البحار أصبح ذات مفهوم أكيد ومتزايد لدرجة أن العلماء أصبحوا يبحثون فى بيئات جديدة . فى الثمانينيات على سبيل المثال تم استرجاع الديدان الأنبوبية العملاقة (رفيتا Riftia) من المساحات المجاورة للمواقع المجاورة فى أعماق المحيط ومن ثم اكتشفت أنواع جديدة من Bathymodiolus والتى تعول البكتريا التى تتغذى على الميثان فى أنسجة الخياشيم حيث اكتشفت حول مواقع الميثان فى خليج المكسيك. معظم الأنواع الجديدة التى وصفت كانت وسوف تستمر من الكائنات الدقيقة ولو أنه من الواضح أن النباتات والحيوانات البحرية الجديدة مازالت تنتظر من يكتشفها . يمكن القول انه ما أمكن اكتشافه من البكتريا البحرية والكائنات الأرضية لا يتعدى ١% وقد أمكن عزلها وتوصيفها . البيئة البحرية تمثل مصدر خصب ذات خصوصية لأنواع جديدة من البكتريا كما تأكد من الكشف الحديث عن أرشيا archaea المياه الباردة غير العادية على عروض ١٠٠ – ١٥٠ متر فى المحيط . هذه البكتريا تمثل نسبة مئوية عالية من الدنا الريبوسومى البكتيرى فى عينات مياه البحار ولذلك فأنها لم تعزل حتى الآن فى المزارع النقية كما لم توصف . مثل هذه البحوث قد تقدم مجالات جديدة تساعد فى زيادة فهم العمليات التى تحدث فى المحيطات وبمجرد زراعة هذه الأرشيا قد تكون مصدر للحصول على منتجات جديدة . مازالت هناك أنواع من البكتريا البحرية لا تعد ولا تحصى فى حاجة الى زراعتها وتوصيفها .

الأمراض الوراثية والعلاج بالجينات : تكنولوجيا المستقبل

Genetic diseases and gene therapy : A technology for the future

عمل الخرائط وتتابع الجينومات فى الإنسان والعديد من نماذج الكائنات الحية أحدثت ثورة فى علم الوراثة والوراثية . إن إنتاج كمية غير مسبوقة من المعلومات تزيد وتساعد من تطوير التكنولوجيا وهذا يكون فى صالح وفائدة البحوث البيولوجية فى اتجاهات ومجالات واسعة ومتعددة بحلول نهاية القرن العشرين سوف يتم التتابع الكامل لحوالى ٣٠ جينوم ميكروبى مما سيحدث ثورة فى التشخيص والعلاج الميكروبى . لقد أصبح متوفرا فى الوقت الحالى خرائط وراثية شاملة ودقيقة بعلامات " الدنا " متعدد الأشكال بشكل عالى لجينومات الإنسان والفئران والتى تربط الطرز الوراثى بالجينات المحددة . فى هذه الكائنات الحية فان تعريف الرابطة الوراثية للصفات ذات الجين المنفرد يعتبر من الأعمال الروتينية وسوف يمتد بالتدريج ليشمل الصفات التى يتحكم فيها معقد أو عديد من المواقع (Mure

وآخرون ، ١٩٩٥ ، Russo وآخرون ، ١٩٩٧) . مع توفر المعلمات المبنية على الجينات وتراكمها فان معلومات متجانسة وارتباط بين مخرجات البيانات العلمية سوف تزيد من قيمة هذه المعلمات . الجيل الأول من الخرائط الطبيعية عن الكروموسومات الإنسانية وشرائح "الدنا" المكلونة سوف تسمح فى الحال بتعريف الجينات المرتبطة بالأمراض فى الإنسان على أساس موقعها الكروموسومى . الجينومات الخاصة بالعديد من أنواع البكتريا ساكاروميسيز سيرفيسيا والطحالب تم تتابعها فعلا (Coffeau ، ١٩٩٦ ، Oliver ، ١٩٩٦) . جينومات الإنسان والأرابيدوبسيز والدروسوفيللا سوف يتم تتابعها فورا . جيل الخرائط والتتابعات من الكائنات الحية المختلفة سوف تسمح بتحديد وظيفة خاصة بالتتابعات المختلفة .

سوف يصبح الكمبيوتر وسيلة هامة فى تداول كم المعلومات الهائلة . تحليل وعمل الاستنتاجات للثيرابيتس من تتابع المعلومات يشمل تتابع الكروموسومات المرتبطة والخاصة بالإنسان والتى سوف يحصل عليها من الحاسبات الآلية السريعة . أهمية الأجهزة التى تستطيع تحليل آلاف الجينات سوف تشمل تتابعات "الدنا" الآلية المرتبطة بنظم الفرد الكهربى مع الكشف الفلوريسينى والفرد الكهربى الشعرى ونظم أجهزة الكروماتوجرافى السائل فائق المقدرة HPLC مع الكشف بامتصاص الأشعة فوق البنفسجية وسبكتروميتر الكتلة مع الكشف بأشعة الليزر . إن استخدام شبكة المعلومات سوف يسمح بسرعة البحث وتبادل وتقريز المعلومات والانترنت وعمل الخرائط المرئية الواضحة .

حماس العامة وتطلعهم للعلاج بالجينات أتى من مشروع الجينوم والذى اضطلع بمهام عمل خرائط وتتابع لكل الجينات الادمية . الجينات التى توجد فى صور طفرية يمكن أن تسبب المرض وجدت فى الغالب فى صورة ضعيفة (Varmus and Weinberg ، ١٩٩٥) . أن المردود الواقعى والعملى لمشروع الجينوم الإنسانى سوف يقدم الفسيولوجى الأساسى الذى سوف يساعد فى تحقيق الأهداف المرجوة . العديد من الأمراض التى مازالت أسبابها الوراثية غير معروفة سوف تظل غير قابلة للعلاج الشافى أو التعريف . العلاج بالجينات عبارة عن اصطلاح عام للمعاملات التى تحاول علاج أو حسر الأمراض من خلال التضاعف الجينى (Feng وآخرون ، ١٩٧٧ ، Yang وآخرون ، ١٩٩٧ ، Zufferey وآخرون ، ١٩٩٧) . هذا الاقتراب يتضمن إدخال الجينات فى الخلايا بهدف أن تعطى الخلايا المقدرات ألتى تنقصها أو للتوجيه المباشر لسلوك الخلايا بطرق خاصة (Wang وآخرون ، ١٩٩٧) . العلاج بالجينات لمعالجة الأمراض الآدمية وتضاعف الجينات سوف تثبت فائدته فى المستقبل . يوجد الآن ما يقرب من ١٠٠ دراسة تتناول الخلايا الجسمية والتى لا تتجاوب مع التغيرات الوراثية التى يصفها الإنسان لذرية المرضى

(Crane وآخرون ، ١٩٩٥) . حتى لو نجح هذا الاقتراب فان التغيرات التى تحدث للعلاج بجين الخلية الجسمية سوف يموت مع الشخص الذي استقبل المعاملة . إدخال الجينات فى الخلايا يمثل الصعوبة الكبرى لتى تواجه العلاج بالجينات . الفيروسات القادرة على الارتباط بالغشاء الخلوى وبعدئذ تحقن جيناتها داخل الخلية تحقق نقل جينى قليل مما يجعل من الصعوبة ضرب واقتحام الخلايا المستهدفة . مازالت هناك حاجة لتحسين الناقلات للجينات فى الخلايا .

المستقبل : مركبات جديدة لقرن جديد

The Future : New products for a new century

لقد عاودت التكنولوجيا الحيوية شبابها من خلال الثورة التكنولوجية فى البيولوجيا الجديدة (Berg ، ١٩٩١ ، Darnell وآخرون ، ١٩٩١) . العقد الأخير من القرن العشرين سوف يغير من الآمال المعقودة على المنتجات بسبب ان العديد من المنتجات الحيوانية أو المنتجات لصالح الحيوان والجنس البشرى ستكون فى خطوط الإنتاج . أن الثورة والفوران فى مختلف مسارات التمثيل سوف ينتج جزيئات ذات أهمية تجارية (Bailey ، ١٩٩١) . التحدى يتمثل فى إنتاج تراكيب كيميائية معقدة مثل هورمونات التاكسول والاستيرويدات من خلال التخمر الميكروبى . الهندسة الوراثية لمسارات التمثيل التى تشمل الجينات المتعددة تمثل التحدى الثانى لمهندسى الوراثة . الجينات الشائعة سوف تصبح فى المتناول من خلال تتابع العديد من الجينومات التى دخلت فعلا فى حيز التنفيذ . يمكن لأى باحث أن يقوم بعزل هذه الجينات بواسطة تفاعل PCR أو الحصول عليها بواسطة التخليق الكيميائى مع ملائمة الكودون للتعبير فى الأحياء المستهدفة . إن تتابع جينوم الأرابيدوبسيز سوف تنتج تركيب الجينات النباتية الكبرى . ان تيسر التتابع للجينوم الكامل للطحلب سوف يسمح بعزل العديد من الجينات النباتية بواسطة تفاعل سلسلة البوليميريز PCR . من جهة اخرى فان الجينات المتميزة المشتركة فى التمثيل الثانوى تجابه قيودا تقسيمية فى التوزيع . التنوع الحيوى للكائنات الحية يعتبر مخزن لهذه الجينات . عزل وتسجيل براءات اختراع هذه الجينات سيكون ذات قيمة اقتصادية كبيرة . العديد من الأحماض الدهنية المتميزة والتى تمثل مصادر للعطور ومغلفات البلاستيك ومواد التجميل توجد فى عدد من الأحياء المتنوعة تقسيميا . بعض من هذه الجينات يمكن عزلها بواسطة التهجين Subtractive .

التنوع الحيوى له قيمته وأهميته ولكن هناك أوقات مناسبة يمكن أن يستخدم بكل مقوماته وطموحاته لتحقيق الفوائد المرجوة منها . التكنولوجيا الجديدة بدأت بإحلال

مصادرالمنتجات . لقد بدأ التاكسول فى الإنتاج من خلال التخليق الكيميائى والانزيمى . اليام المكسيكى كان هو المصدر الأكبر للاستيرويدات منذ زمن ولكن أمكن إحلاله بالسيتوستيرول من فول الصويا . العديد من مواصفات زيوت جوز الهند أصبحت موجودة الآن فى زيوت الكانولا المهندسة وراثيا . بروتين طعم الشيكولاتة والثاوماتين تنتج الآن فى الخميرة . العديد من البروتينات ذات الأحماض الأمينية يمكن أن يعبر عنها الآن من خلال الجينات المخلقة . نماذج الكمبيوتر للتراكيب الانزيمية قد تمكن من التنبؤ بتتابع الحمض الأمينى الضرورى لإحداث الوظيفة مما سيفتح المجال للمواد المساعدة الحيوية .

المحاصيل المحورة وراثيا تمثل تطور جديد فى تربية النباتات . مربى النباتات لم ينتظروا طويلا حتى يضعوا القيود على الجينات فى النباتات التى يمكن أن تعبر مع الأصناف المطلوب تحسينها . كل ممالك الأحياء تعتبر الآن مصدر للجينات وقد أدت التكنولوجيا الجديدة الى توسيع كبير جدا ودرامى فى مجموع الجين . لقد أمكن التحكم فى نقل الجين بحيث يمكن إدخال التتابعات ذات الصفات الجيدة المرغوبة فقط . المعلومات الخاصة بجين الارابيدوبسيس سوف يسمح بعزل جينات مماثلة فى المحاصيل (Mena وآخرون ، ١٩٩٥) عمل خرائط لموقع الصفة الكمية (QTL) تقدمت بسرعة . الأجهزة المرتبطة بالحاسب الآلى ساعدت كثيرا فى ازدواج العلامات المتتابعة المعبر عنها (EST) مع (QTL) . المقارنات المتجانسة والجين المتجانس وإحلاله فى الخميرة وتحديد الوظائف الخاصة بالتتابعات الجديدة من خلال التكنولوجيات الأخرى .

إدخال الجينات المبتورة truncated فى كلا التوجيه الفاعل والمعطل تخفض التعبير عن الجينات الموجودة . لقد استخدم هذا المردود بشكل زائد لتحوير التمثيل فى النباتات . النضج المتأخر لثمار الخضراوات التى تنضج بعد فوران التنفس وانفراد الاثيليين مثل الشمام والطماطم قد أمكن تحقيقه بواسطة اقترابات متعددة . الجلوكوسينات الذى أدخل فى الشلجم من اللفت مع جين حافظ لخصوبية الذكور يمكن التخلص منه بواسطة إدخال جين التخليق الحيوى للجلوكوسنيولات المبتورة . قيمة كعكة بذور الخردل يمكن اسراعها وزيادتها بكلونة الجينات للبروتينات مثل جين أوف البيوميل تحت تحكم منشط البذور الخاص . البروتين المضاد للتجمد لدودة البراعم قد يعبر عنه فى الفواكه لتحقيق تحمل للبرودة (Tyshenko ، وآخرون ، ، ١٩٩٧) . التأثيرات النافعة للتعبير عن جين فيتريوسليلا الهموجلوبين فى النباتات مازالت تلقى التحفظ والاهتمام (Holmberg وآخرون ، ١٩٩٧) . الحماية ضد الفيروسات قد يمكن تحسينها بشكل معنوى كبير ومن ثم تساهم لحد كبير فى تحقيق الأمن الغذائى . المحاصيل المقاومة للفيروسات سوف تتطلب مبيدات حشرية أقل لمكافحة الناقلات الحشرية للفيروس . أن فهم تقنية فعل جينات المقاومة

النباتية قد تسمح بتفصيل الجينات المخلقة التى قد تستخدم لمكافحة الأمراض النباتية (Bent ، ١٩٩٦ ، Staskawicz وآخرون ، ١٩٩٥) . التعبير عن الجينات فى نظام متخصص تحت التنظيم والسيطرة فى التطور سوف يتطلب منشطات خاصة ويثير الاهتمام فى التطبيق .

التعبير عن الجينات الخاصة يحسن من طعم الثمار . المحاصيل المهندسة وراثيا من خلال تحسين تركيب النشا والسليلوز والتى تقلل من التحويرات الكيميائية وتقلل من الفاقد فى خطوط الإنتاج الصناعى . تحسين السليلوز سوف يسهل من الهضم ومن ثم يفيد فى الاستخدامات النهائية له . القطن ذات الألياف الملونة يلوح فى الأفق وقد يسوق فى بداية هذا القرن . النباتات ذات البناء المحور والتى بها سليلوز ولجنين قوى أصبحت فى الإمكان. الأوراق الكبيرة القليلة العدد قد تكون ميزة فى بعض الحالات . إن تصميم جينات محورة قد يساهم بشكل معنوى فى المزرعة فى القرن الواحد والعشرين . المعلومات الخاصة بوضع الكربون والعلاقة مع الماء قد تستخدم لتحوير حجم العضو الذى تم مضاعفته من خلال تحوير تمثيل السكروز . فى نباتات البطاطس فان التعبير عن انفرتيز الخميرة والموضع الانقباضى Cytosolic لها تفرتيز الخميرة الناتج يزيد من أعداد الدرنات ذات الأحجام الصغيرة . الأهداف الأبوبلاستيك لا نفرتيز الخميرة أدت الى زيادة حجم الدرنات وأنقصت عددها فى كل نبات . لقد استخدم الباحث Mavingui ومعاونوه ، ١٩٩٧ التكبير العشوائى للحمض النووى " الرنا " (RDA) لتحسين سلالات الريزوبيوم من خلال تحسين صفة المعيشة التكافلية (Haselkorn ، ١٩٩٧) . إن عمل ملائمة للتغذية المعدنية والانتقال والبناء فى البيئات ذات الاجهاد تحت ظروف الجفاف والملوحة لتحقيق الاستفادة الكبرى من كمية السماد المحدودة ذات قيمة معنوية فى الإنتاج .

هندسة الزيوت فى الطعام الآدمى الحديث وكذلك للاستخدام كمخزون غذائى لصناعة الكيميائيات تمثل إمكانية هائلة . الزيت المحتوى على أحماض دهنية غير مشبعة وتوازن من المشبعات الأحادية والعديد مطلوبة . المشتقات الأحادية ذات تأثيرات صحية إيجابية مع وظائف ثابتة فى الطعام . عباد الشمس المحتوى على نسبة عالية من زيت الأوليك تم إنتاجه من خلال التربية النباتية ولكن التكنولوجيات الجديدة تسمح بالتضاعف الجديد الدقيق والمكثف لمكونات وتركيب الزيت . نقل الجينات للأحماض الدهنية غير العادية من النباتات البرية فى المحاصيل الزيتية المزروعة قد يقدم مخزون غذائى كبير للصناعة . حمض اللوريك وهو الحمض الدهنى المحتوى على ١٢ ذرة كربون يستخدم فى المنظفات . لقد أمكن الحصول عليه من زيت جوز الهند أو من خلال التحوير الكيميائى للحامض الدهنى الايدروكسيلى المحتوى على ١٨ ذرة كربون من زيت الخروع . الآن

زيت الشلجم المحور وراثيا بالجين من شجرة اللوريل لإنتاج حامض اللوريك دخلت مرحلة الإنتاج التجارى الآن . المحاصيل المهندسة وراثيا ذات المستويات العالية من حامض اليوريسك والتى تستخدم فى صناعة النيلون مطلوبة جدا (Lassner وآخرون ، ١٩٩٥ ، Brough وآخرون ، ١٩٩٦) .

النباتات الخناث المهندسة وراثيا (الذرة والكانولا والهندباء) مع الجينات السائدة المسيطر عليها لتعقيم الذكور لاقت قبول وشيوع وأصبحت تستخدم فى إنتاج هجن التقاوى . الاستخدام المتحكم فيه للصفات الخنثية فى المحاصيل تمثل التحدى التالى . التناسل العذرى عبارة عن التكاثر اللا جنسى للنبات من خلال التقاوى . نباتات الهجن ذات الصفات الخنثية أو التناسل العذرى قد تتكاثر دون أن تمر خلال التهجين . الاستخدام المعملي للتناسل العذرى قد يزيد من استخدام الهجن للمحاصيل مثل القمح والأرز حيث أن التهجين من الصعوبة بمكان . الأساس الجزيئى للتناسل العذرى عندما يوصف سوف يصل بالباحث الى التناسل الضرورى تحت السيطرة (Koltunow ، ١٩٩٣) .

إن إنتاج المواد الصيدلانية فى النباتات يجذب اهتمام العلماء والمؤسسات العلمية ولكنه ذات تكاليف باهظة . الفاكسينات التى تؤخذ عن طريق الفم من النباتات أصبحت ممكنة (Dalsgard ، ١٩٩٧) ولكن كفاءتها فى الإنسان مازالت فى حاجة الى التقويم (Moffat ، ١٩٩٥) . إنتاج الانزيمات فى المحاصيل الورقية التى تزيد من كفاءة هضمها بواسطة الأبقار سوف تفتح مجالات جديدة للاستغلال والتطبيق . إن تتابع الجينوم الإنسانى ذات عزم ثقيل (Adams وآخرون ، ١٩٩١) . المعلومات عن الأساس الكامل لتتابع الجينوم الإنسانى سوف يقدم بصمة زرقاء عن الجينوم الإنسانى . تتابعات الحمض النووى "الدنا" التى تشفر للعديد من المستقبلات والجزيئات الأخرى التى توجه التمثيل فى الإنسان والجهاز العصبى والمناعة والعمر سوف تزداد فهما ومعرفة . هذه المعلومة قد تستخدم لإنتاج كميات غير محدودة لبعض المواد التى توجد فى جسم الإنسان بكميات ضئيلة فقط . بعض من هذه المواد قد تكون ذات قيمة صيدلانية . مثال ذلك تيسر كل الجينات المشتركة فى تمثيل الاستيرويدات والتى تؤدى الى فهم أفضل للتكاثر فى الإنسان وتحسين السيطرة على المواليد (Tannin وآخرون ، ١٩٩١) . قد يصبح فى الإمكان زراعة الجينات الآدمية فى الخميرة لإنتاج ستيرويدات علاجية مماثلة لتلك التى تخلق فى الإنسان . بالإضافة الى ذلك فان العديد من الجزيئات التى تشترك فى تنشيط نظام المناعة وخفض الألم قد ينتج تجاريا .

توفر المعلومات وتيسر العديد من المستقبلات التى تشترك فى تطبيع الأنشطة الحية خلقت مجالا جديدا فى اكتشافات صناعة المواد الصيدلانية (Finberg وآخرون ، ١٩٩١) معظم المواد والروابط التى تنتج ميكروبيا والتى قد تتداخل مع هذه المستقبلات قد تنتج من برامج اختبارات المقارنة . المستقبل مشرق حيث تزيد التكنولوجيات الجديدة من سرعة حل الموضوعات التى لم تكن فى الحسبان منذ عقد مضى (Culuer وآخرون ، ١٩٩١) . الأمل المحدد يتمثل فى التخيل الإنسانى والبراعة والمهارة . الأجهزة والمعدات فى غاية الأهمية . إن دراسة فسيولوجية الكائنات الحية عديدة الخلايا وكاشفات الإنسان الآلى للكشف عن منتجات التمثيل سوف تتطلب تحسين الأجهزة . من الصعوبة بمكان تصور الحياة بدون البنسلين والبوليو والفاكسينات الأخرى ونظام تنقية الماء فى نظم التنقية فى البلديات والحبوب المقاومة للأمراض وكذلك فى الخضراوات وعلاجات السرطان المتقدمة . التكنولوجيات التى تؤثر على مستوى المعيشة سوف تحدث تنافس كبير بين أفراد المجتمع من خلال توفير فرص عمل . التكنولوجيات ذات مردودات كبيرة من خلال الحصول على منتجات ذات قيمة من خلال التعاون الكبير بين الجامعات والصناعة . الدول المتقدمة تتطلع إلي تحقيق التوازن بين قيادة التكنولوجيا بالتوازى مع القيادة السياسية .

جدول (٨-١) : بعض المنتجات الميكروبية ذات القيمة الاقتصادية (أمثلة مختارة)

مجموعة المنتج	الأمثلة	الاستخدامات النهائية
أحماض أمينية	Cysteine , Lysine , glutamate , methionine , proline , threonine , phenylalanine , tryptophan	محسنات الغذاء – مكسبات طعم
بوليمرات حيوية	Polyamylose , poly-β-hydroxybuterate	مواد تغليف تتحلل حيويا
	Alginate , cellulose , curdlan , levan , dextran , xanthan	مكثفات غذائية
خلايا ميكروبية	Yeast , Lactobacilli , streptococci	صناعات الجبن – خمائر – فى المخبوزات والخمور
ستيرويدات	Cortisone	علاج التهاب المفاصل
الكالويدز الارجوت	Ergotamine , agroclavind	مواد علاجية
بروتينات ميكروبية	Methylophilus methylotrophus , yeast , algae	بروتينات خلوية فردية
فيتامينات	B-2,B-12D,C, nicotinic acid	مضافات للغذاء
ببتيدات –بروتينات	Aspartame , thaumatin	محليات
كاروتينويدات	B- Carotene	مواد تلوين
أحماض عضوية وغيرها	Geraniol , isobutylene , linalool , nerol , nucleotides , acetic acid , benzoic acid , citric acid , fumaric acid	مكسبات طعم
	Gibberellins	منظمات نمو نباتية

جدول (٨-٢) : قليل من المضادات الحيوية ذات الأهمية الاقتصادية (أمثلة مختارة)

المضاد الحيوي	الصورة الكيميائية	الكائن المنتج	الشركة المنتجة	الاستخدام
Actinomycin	Peptide	*S.antibioticus*	Bayer AG, Merck	مضاد ورم
Adriamycin	Anthracycline	*S.peuceticus* var. caesium	Farmitalia, Kyowa Hakko Kogyo, Rhome-Poulenc	مضاد ورم
Avermectins	Macrolide	*S.avermitilus*	Merck	مضاد للديدان
Butiriosin	Aminoglucoside	*Bacillus circulans*	Kyowa Hakko Kogyo	مضاد بكتيري
Candicidin R	Polyene	*S.griseus*	Penick	مضاد فطريات
Cephalosporin	B Lactam	*Acremonium chrysogenum*	Antibiotics SA, Brystol Myers, CIBA-Geigy, Eli Lilly, Farmitalia, Fujisawa Glaxo Hoechst AG, Merck, Novo, Takeda	مضاد بكتيري
Cephalosporin	B Lactam	*S.lactamdurans*	Merck	مضاد بكتيري
Clavulanic acid	B Lactam	*S.clavuligerus*	Beecham Pharmaceutical	مضاد بكتيري
Cyclosporin A	Peptide	*Tolypoeladium inflatum*	Biochemie GmbH, Sandoz	مخفض مناعة
Daunorubicin	Anthracycline	*S.coeruleorubidus*	Rhone Poulenc, Farmitalia	مضاد ورم
Erythromycin	Macrolide	*S.erythreus*	Abbott, Eli Lilly, Pfizer, Roussell-Uclef, Upjohn	مضاد بكتيري
Gentamicins	Aminoglycoside	*Micromonospora purpurea*	Schering	مضاد بكتيري
Monensin	Polyether	*S.cinnamonensis*	Eli Lilly	مضاد للكوكسيديا
Penicillin	B Lactam	*Penicillium chrysoginum*	Bristol-Myers, Gist-Brocades, Merck, Pfizer	مضاد بكتيري
Rifamycin	Ansamycin	*Nocardia mediterranei*	CIBA Geigy, Dow, Lepetit	مضاد بكتيري
Spectinomycin	Aminocyclitol	*S.spoectabilis*	Upjohn	مضاد بكتيري
Streptomycin	Aminoglycoside	*S.griseus*	Gist-Brocades, Merck	مضاد بكتيري
Tetracycline	Polyketide	*S.aureofaciens*	American Cyanamid	مضاد بكتيري
Thienamycin	B Lactam	*S.,catteya*	Merck	مضاد بكتيري

جدول (٨-٣) : الأدوية والفاكسينات الناتجة من التكنولوجيا الحيوية ومازالت رهن التطوير فى الولايات المتحدة الأمريكية (أمثلة مختارة)

التعليمات وتاريخ الموافقة	الشركة المنتجة	اسم المنتج
Management of chronic granulomatous disease (December 1990).	Genentech (S. San Francisco	Actimmune interferon gamma-lb
Acute myocardial infarction (November 1987): acute massive pulmonary embolism (June 1990)	Genentech (S. San Francisco)	Activase, alteplase, recombinant
Genital warts (October 1989)	Interferon Sciences (New Brunswick, NJ)	Alferon N interferon alfa-n3 (injection)
Relapsing, remitting multiple sclerosis (July 1993)	Berlex Laboratories (Wayne, NJ) Chiron (Enmeryville, CA)	Betaseron recombinant interferon beta-lb
Treatment of Gaucher's disease (May 1994)	Genzyme (Cambridge, MA)	Cerezyme TM imiglucerase for injection (recombinant glucocerebrosidase)
Hepatitis B (September 1989)	SmithKline Beecham (Philadelphia, PA)	Engerix-B hepatitis B vaccine (recombinant)
Treatment of anemia associate with chronic renal failure, including patients on dialysis and not on dialysis, and anemia in Retrovir-treated HIV-infected patients (June 1989); treatment of anemia caused by chemotherapy in patients with non-myeloid malignancies	Amgen (Thousand Oaks, CA)	EPOGEN Epoetin alfa (rEPO)

جدول (٨-٤) : مبيعات منتجات التكنولوجيا الحيوية الأمريكية (كما هو متوقع بـــالمليون دولار ، ١٩٩٦) .

الاستخدامات	١٩٩٦ كأساس	سنوات الاستبيان		المتوسط السنوى لمعدل النمو %
		٢٠٠١	٢٠٠٦	١٩٩٦ – ٢٠٠٦
مواد علاجية للإنسان	٧٥٥٥	١٣٩٣٥	٢٥٥٤٥	١٣
مواد تشخيص فى الإنسان	١٧٦٠	٢٧٠٥	٤٠٥٠	٩
الزراعة	٢٨٥	٧٤٠	١٧٤٠	٢٠
استخدامات خاصة	٢٧٥	٦٩٠	٤٦٠٠	١٩
مشخصات غير طبية	٢٢٥	٣٣٠	٤٦٥	٨
المجموع	١٠١٠٠			

جدول (٨-٥) : توقعات المبيعات الأمريكية وسنة الموافقة علـــى الأدويـــة فـــى أمريكـــا بالتكنولوجيا الحيوية فى عام ٢٠٠٣

سنة الموافقة في امريكا	مليون دولار	المنتج
1991	1,450	G-CSF
1989	1,450	Erythropoietin
-	1,400	Other vaccines
-	700	Other monoclonal antibody drugs
-	680	Artificial blood and organs
1986	600	Interferon-alpha
1982	520	Human insulin
1985	440	Human growth hormone
-	420	Hormones (including calcitonin)
1993	375	Interferon-beta
1986	360	Hepatitis B vaccine
1992	360	IL-2 and other interleuckins
-	350	Other growth factors
1991	240	GM-CSF
1992	220	Clotting factors; FACTOR VIII
1994	180	Ceredase/Cerezyme
1990	150	Interferon-gamma
-	115	OKT3
1993	100	Pulmozyme (Dnase)
-	60	CD4
1987	40	t-PA
	3,000	Otrher biotech and vaccines

جدول (٨-٦) : بعض الأنزيمات الصناعية : المصادر والاستخدامات (أمثلة مختارة)

الاستخدامات	المصدر	الانزيم
Detergents, meat tenderizer, chill-proofing beer, cheese, and flavor production	*Bacillus subtilis, B.licheniformis*	Proteases
Cheese production	*Calf and lamb stomachs, microbes*	Rennin
Meat, beer, leather textiles, pharmacuticals, tenderizer, digestive aid, dental hygiene, clarification of beer haze	Papaya	Papain
Meat, beer, pharmaceuticals	Pineapple cannery residues	Bromelin
Meat, beer, pharmaceuticals, leather	Figs	Ficin
Cereals, pharmaceuticals, feeds	Hog stomachs	Pepsin
Meat, pharmaceuticals	Hog and calf pancreases	Trypsin
Hydrolyze starch for ethanol. Production, detergents, baked goods, milk, cheese, beer, fruit juices, digestive aid, dental hygiene	*Aspergillis niger, A.oryzae, Bacillus licheniformis, B.subtilis,* recombinant organisms, barley malt	Amylases
Produce invert sugar, confectionary distilled beverages	*Saccharomyces cerevisiae*	Invertases
Raffinose hydrolysis	*Mortierella vinaceae*	α-D-Galactosidase
Lactose hydrolysis	*Aspergillus niger*	β-D-Galactosidase
Convert glucose to frutcose, production of high-fructose corn syrup for soft drinks, also other beverages and foods	*Streptomyces olivaceus, Escherichia coli, Arthrobacter globiformis, Actomoplanes missoriensis*	Glucose isomerases
Steroid conversions	*Curvularia lunata*	11-β-Hydroxylase
Optical resolution of α-amino acids	*Aspergilolus oryzae*	Aminoacylase
L-aspartic acid from fumaric acid	*E.coli*	Aspartase
L-malic acid from fumaric acid	*Brevibacterium ammoni-agenes*	Fumarase
D-phenylalanide from D, L-phenyl hydantoin	*Bacillus brevis*	Hydantoinase
Acrylamide from acrylonitrile L-phenylalanine	*Corynebacterium sp.*	Nitrilase
Hydrolyze pectic substances, clearing of fruit juices, wine, coffee, cocoa	*Fungi, tomatoes*	Pectinases

جدول (٨-٧) : المندمجات من المواد العلاجية والفاكسينات التى ووفـق عليـها (أمثلـة مختارة)

الشركة والاسم التجاري	التعليمات	المنتج	السنة
Eli Lilly Genentech (Humulin)	Diabetes	Human insulin	1982
Genentech (Protropin)	hGH deficiency in children	Somatrem for injection	1985
Hoffmann-La Roche (Roferon-A)/Merck (Recombivax HB); Chiron/Ortho Biotech (Orthoclone OKT3)	Hairy cell leuckemia/ Hepatitis B prevention/	Interferon-a-2a/ Hepatitis B vaccine, MSD/Muromonab - CD3	1986
Schering - Plough / Biogen (Intron A)	Hairy cell leukernia	Interferon-a-2b	
Eli Lilly (Humatrope)	hGH deficiency in children	Somatropin for injection	1987
Genentech (Activase)	Acutemyocardial infraction	Alteplase (TPA)	

جدول (٨-٨) : المحاصيل المهندسة وراثيا التى تسوق تجاريا فى أمريكا

الشركة المالكة	المحصول	الطرز الوراثية
Calgene , Monsanto , Agritope	الطماطم	ثمار بطيئة النضج
Calgene	القطن	تحمل مبيد الحشائش
Monsanto	فول الصويا	تحمل مبيد الحشائش
Calgene	الكانولا	جينات الزيت
Upjohn	الكوسة	مقاومة للفيروسات
DNA Plant Technology	الطماطم	ثمار بطيئة النضج
Monsanto	البطاطس	مقاوم للحشرات
Ciba – Geigy	الذرة	ثمار بطيئة النضج
Zeneca and Petoseed	الطماطم	تحمل مبيد الحشائش
AgEvo , De Kalb	الذرة	مقاوم للحشرات
Monsanto	القطن	تحمل مبيد الحشائش
Monsanto , Du Pont	القطن	مقاوم للحشرات
Monsanto , Northrop King	الذرة	تعقيم الذكور وتحمل مبيد الحشائش
Plant Genetic Systems	الذرة	
Comell Univ. and Univ. of Hawaii		

جدول (٨-٩) : أنواع النباتات المقاومة للفيروسات التى أختبرت فى أمريكا (أمثلة)

الفيروس	الجين	المحصول
Alfalfa mosaic	Coat protein	Alfalfa
Barley yellow dwarf	Coat protein	Barley
Beet necrotic yellow vein	Coat protein	Beet
Maize chlorotic mottle	Coat protein	Corn
Maize chlorotic dwarf	Coat protein	Corn
Maize dwarf mosaic	Coat protein	Corn
Cucumber mosaic	Coat protein	Cucumber
Cucumber mosaic, watermelon Mosaic 2, zucchini yellow mosaic	Coat protein	Cucumber
Bean yellow mosaic	Coat protein	Gladiolus
Tomato spotted wilt	Nucleocapsid	Lethuce
Zucchini yellow mosaic	Antisense coat protein	Melon
Cucumber mosaic, papaya ringspot, watermelon mosaic 2, zucchini yellow	Coat protein	Melon

جدول (٨-١٠) : الطرز الوراثية للنباتات المقاومة للبكتريا والفطريات فى أمريكا (أمثلـــة مختارة)

مصدر الجين	الجين	المرض	المحصول
Hyalophora cecropia	Attacin	*Erwinia amylovora*	Apple
Chicken	Lysozyme	*E.amylovora*	
H.cecropia	Cecropin B	*E.amylovora*	
Tobacco	Glucanase	*Phytophthora*	Cucumber
Tobacco	Osmotin	*Phytophthora*	
Tobacco	Chitinase	*Phytophthora & Verticillium*	
Tobacco	Osmotin	Downy mildew	Lettuce
Tobacco	Chitinase	Downy mildew	
Tobacco	Glucanase	Downy mildew	
Tobacco	Ghitinase	*Phytophthora*	Melon
Tobacco	Glucanase	*Phytophthora*	
Tobacco	Osmotin	*Phytophthora*	
Tobacco	Glucanase	*Rhizoctonia solani*	Potato
Serratia marcescens	Chitinase	*R.solani*	
Tobacco	Glucanase	*R.solani*	
Pea	DRRG 49	*Verticillium*	
H.cecropia	Cecropin B	*Corynebacterium sepedonicum*	
H.cecropia	Cecropin B	*E.carotovora*	
Chicken	Lysozyme	*Soft rot and Ring rot*	
H.cecropia	Cecropin B	*Streptomyces scabies*	
Tobacco	Glucanase	Soft rot	

جدول (٨-١١) : الأطعمة المهندسة وراثيا فى الأسواق الأمريكية (أمثلة مختارة)

	الوكالة والقرار	الغرض	الصفة التي تغيرت	الشركة	المنتج
Laurical	USDA/Approved FDA/Approved (2) EPA/Not required	Expand use in soap & food products	Altered oil corn-position-high lauric acid	Calgene	Canola (Oilseed rape)
Matimizer	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Approved	Control insect pests	Resistance to corn borer (Bt toxin)	Ciba-Geigy	Corn
Nature-Card	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Approved	Control insect pests	Resistance to corn borer (Bt toxin)	Mycogen	Corn
BxN Cotton	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Approved	Control weeds	Resistance to herbicide bromoxynil	Calgene/ Rhone Poulenc	Cotton
Bollgard	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Approved	Control insect pests	Resistance to boll-worms & bud-worn (Bt-toxin)	Monsanto	Cotton
Roundup Ready	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Approved	Control weeds	Resistance to herbicide glyphosate	Monsanto	Cotton
New Leaf	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Approved	Control insect pests	Colorado potato beetle (Bt-toxin)	Monsanto	Potato

REFERENCES

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulo, S., Xiao, H., Merrill, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McComble, W.R. and Venter, G.J. (1991). Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. Science 252: 1651-1656.

Arnold, F.H. and Haymore, B.L. (1991). Engineered metal binding proteins: purification to protein folding. Science 252: 1796-1797.

Bailey, J.E. (1991). Toward a science of metabolic engineering. Science 252: 1668-1675.

Banerjee, S., Livanos, E. and Vos, J.H. (1995). Therapeutic gene delivery in human beta-lymphablastoid cells by engineered non-transforming infectious Epstein-Barr virus. Nature Medicine 1: 1303-1308.

Bird, R.E., Hardman, K.D, Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. and Whitlow, M. (1988). Single chain antigen binding proteins. Science 242: 423-426.

Chaplin, M.F. and Bucke, C. (1990). Enzyme Technology, Cambridge University Press, Cambridge.

Chrispeels, M.J. and Sadova, D.E. (1994). Plants Genes and Agriculture. Jones and Bartlett Publishers, London.

Crane, G.M., Ishaug, S.L. and Mikos, A.G. (1995). Bone tissue engineering. Nature Medicine 1: 1322-1324.

Dalsgaard, N. (1997). Plant derived vaccine protects target animals against a viral disease. Nature Biotechnology 15: 248-252.

Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore, D. (1991). Molecular Cell Biology. W.H. Freeman and Co., New York, NY.

Ecker, J.R. (1997). Brightening the pathway to steroid hormone signaling events in plants. Cell 90: 825-827.

Erlich, H.A., Gelfand, D. and Sninsky, J.J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. Science 252: 1643-1651.

Farbood, M.I. (1991). Microorganisms as a novel source of flavor compounds. Biochem. Society Transactions 19: 690-694.

Feng, M., Jackson, W.H., Goldman, C.K., Rancourt, C., Wang, M., Dusing, S.K., Wiegel G. and Curiel, D.T. (1997). Stable in vivo gene transduction via a novel adenoviral/retroviral chimeric vector. Nature Biotechnology 15: 866-870.

Fuente, J.M., Rodriguez, V., Ponce, J.L. and Herrera-Estrella. (1997). Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. Science 276: 1566-1568.

Gadvani, F. (1990). Genetic engineering of plants for virus resistance. Arch. Virol. 115: 1-22.

Gill, G.S., Zawoski, P.G., Marotti, K.R. and Rehberg, E.F. (1990). A novel screening system for yeast strains capable of secreting tissue plasminogen activator. Bio/Technology 8: 956-958.

Goffeau, A. (1996). Life with 6000 genes. Scince 274: 562-567.

Haselkorn, R. (1997). A quick fix using random DNA amplification. Nature Biotechnology 15: 511.

Hobby, G.L. (1985). Penicillin: Meeting the Challenge. Yale University Press, New Haven, CT.

Huston, J.S. (1988). Protein engineering of antibody binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883.

Isogai, T., Fukagawa, M. and Aramori, I. (1991). Construction of a 7-aminocephalosporanic acid biosynthetic operon and direct production of 7ACA in Acremonium chrysogenum. Bio/Technology 9: 188-191.

Jacobsen, J.R., Hutchins9on, C.R., Cane, D.E. and Khosla, C. (1997). Precursor-directed biosynthesis of erythromycin analogs by an engineered polyketide synthase. Science 277: 367-369.

Lillehoj, E.P. and Malik, V.S. (1989). Protein purification. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 40: 19-71.

Lillehoj, E.P. and Malik, V.S. (1991). High resolution electrophoretic purification and structural microanalysis of peptides and proteins. Adv. Appl. Microbiol. 36: 279-338.

Malik, V.S. (1979). Genetics of applied microbiology. Adv. Genetics 20: 37-114.

Malik, V.S. (1981). Recombinant DNA technology. Adv. Appl. Microbiol. 27: 1-84.

Malik, V.S. (1982). Genetics and biochemistry of secondary metabolism. Adv. Appl. Microbiol. 28: 27-225.

Olivera, B.M., Hillyard, D.R., Marsh, M. and Yoshikami, D. (1995). Combinatorial peptide libraries in drug design: Lessons from venomous cone snails. Trends Biotechnology 13: 422.

Oliver, S.G. (1996). From DNA sequence to biological function. Nature 370: 597-6000.

Pitts, J.E., Quinn, D., Uusitalo, J. and Penttila, M. (1991). Protein engineering of chymosin and expression of Trichoderma reesei. Biochem. Society Transactions 19: 663-665.

Russo, V.E.A., Martinssen, R.A. and Riggs, A.D. (1997). Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Cold Spring Harbor Lab Press, Plainview, NY.

Schimmel, P. (1990). Hazards and their exploitation in the application of molecular biology to structure-function relationships. Biochemistry 29: 9495-9502.

Seetharam, R. and Sharma, S.K. (1991). Purification and analysis of recombinant proteins. Bioprocess Technology Vol. 12: Marcel Dekker, Inc., New York, NY.

Tannin, G.M., Agarwal, A.K., Moneler, C., New, M.I. and White, P.C. (1991). The human gene for 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase: structure, tissue distribution and chromosomal localization. J. Biol. Chem. 266: 16653-16658.

Varmus, H. and Weiberg, R.A. (1995). Genes and the Biology of Cancer. W.H. Freeman and Co. New York.

Wagner, E.F. (1990). On transferring genes into stem cells and mice. EMBO J. 9: 3025-3032.

Wang, Y., DeMayo, F.J., Sai, S.Y. and O'Malley, B.W. (1997). Ligand inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. Nature Biotechnology 15: 239-243.

World Wide Directory (1995). Genetic Engineering and Biotechnology Related Firms Mega Type Publishing. New York.

Xiong, S., Gerloni, M. and Zanetti, M. (1997). Engineering vaccines with heterologous B. and T cell epitope using immunoglobin genes. Nature Biotechnology 15: 882-886.

Yang, X.W., Model, P.and Heinz, N. (1997). Homologous recombination-based modimification in Escherichia coli and subsequent germine transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. Nature Biotechnology 15: 859-866.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L. and Trono, D. (1997). Multiple attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. Nature Biotechnology 15: 871-876.

الباب التاسع
التأثيرات الأيكولوجية للنباتات المهندسة وراثيا

مقدمـــــــــة :

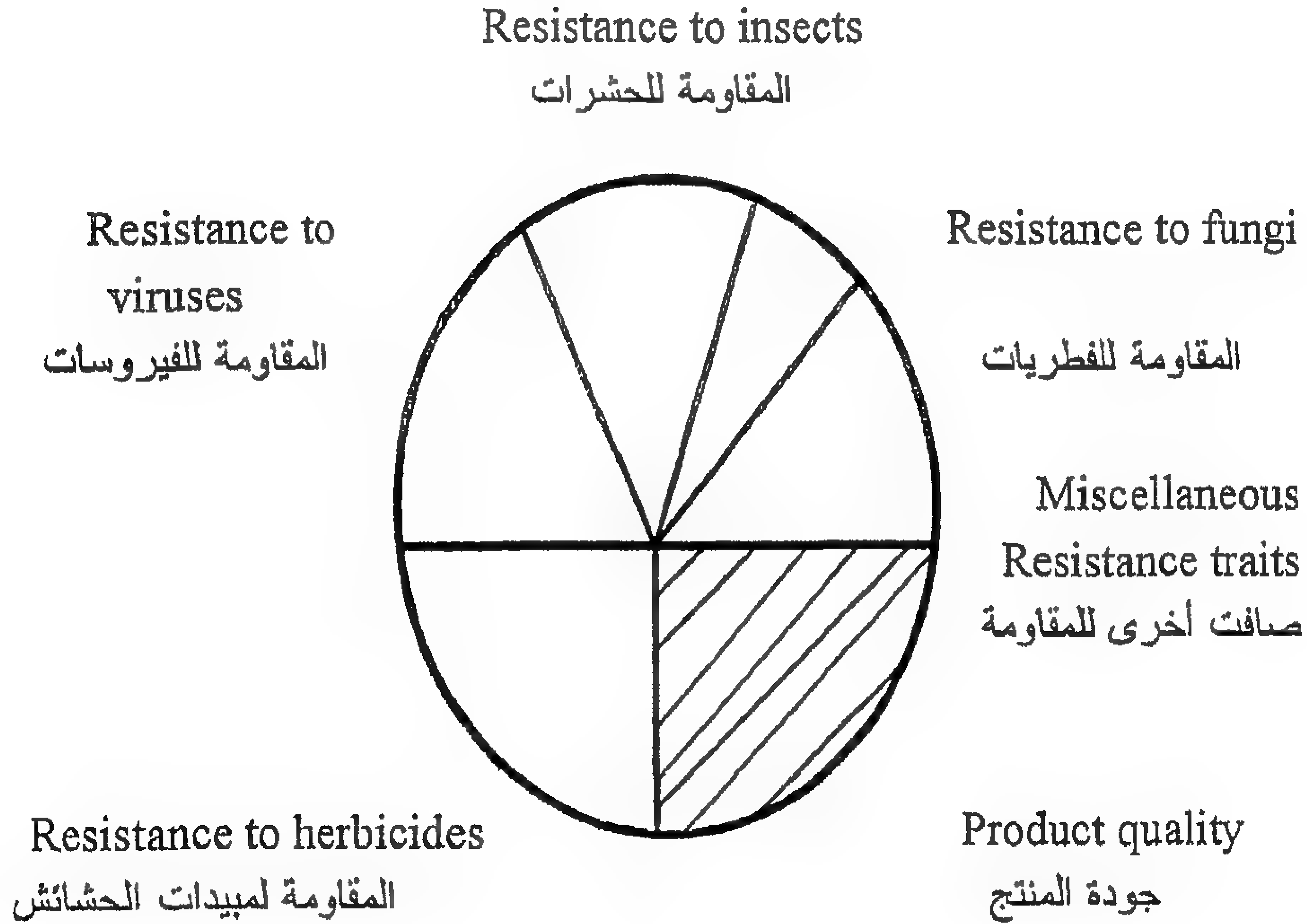
موضوع التأثيرات البيئية للنباتات المهندسة وراثيا بصرف النظر عن الغرض من التحول وكذلك الأمان البيئى والصحى لهذه النباتات كانت وستظل موضع جدل ونقاش الى ان تثبت الحقيقة وهى بعيدة المنال عمداً أو عفواً لاعتبارات أخلاقية وسياسية وإنسانية تحت زعم ومفهوم خاطىء إعطنى السم ولا تقتلنى ... ! أبعد عنى الجوع حتى لو كان الغذاء غير صحى ... اسقنى الماء الملوث ولا تدعنى أموت من العطش . لكل هذا وجدت المقالة الخاصة بالتأثيرات البيئية للنباتات المتحولة وراثيا للسادة البحاث :

Joy Bergelson , Juliette Winterer and Colin B.Purrington Department of Ecology and Evolution , 1101 E, 57 the Street The University of Chicago , Chicago , IL 60637 , USA .

الجانب المؤيد بإطلاق بعدم وجود تأثيرات ضارة باى شكل من الأشكال على صحة الإنسان والبيئة يقول أننا نتعامل مع مخلوقات طبيعية هى النباتات وكل ما فعلناه أننا غيرنا وعدلنا فى البروتينيات المرتبطة بالانزيمات والمواد البيوكيميائية فى نفس النباتات تحقيقا لصفات مرغوبة أو لزيادة الإنتاجية ... أى لا ضرر ولا ضرار . كلام جميل ومعسول أختلف معه تماما حيث لا يوجد شيء نافع على طول الخط بدون أضرار حتى ولو كانت مستترة ... أليست العديد من السموم العاتية ذات طبيعة بروتينية ؟ ونفس الشيء ألا يقال عن الدهون والسكريات وغيرها من المواد الطبيعية ؟ ألم نحصل على سموم عاتية من نباتات وأشجار وأزهار وميكروبات وطحالب وفطريات وأسماك وزواحف وغيرها ؟ لكل مركب ومنتج ضرر ... أليس الضرر محصلة السمية الأساسية للمركب (البصمة) × التعرض ؟ من أين الضرر ؟ من الإفراط فى الاستخدام او الاستخدام الخاطىء ... أليس السجائر من نباتات الدخان ؟ أليس الحشيش والأفيون من مصادر نباتية ؟ يا سادة الحقائق راسخة ومؤكدة ولا تقبل الجدل ولكن التهويل غير مطلوب حتى لا نشقى فوق ما نحن فيه من شقاء .

الفوائد الكبيرة والمؤثرة المحسوسة للنباتات المهندسة وراثيا متنوعة ومتعددة ومثيرة لكل أنواع الإثارة سواء كانت نافعة أو ضارة . لقد أصبحت لدينا المقدرة لإنتاج نباتات ذات

جودة غذائية محسنة ذات مقدرة على تحمل الظروف البيئية المعاكسة كما تكون لها مقـــدرة فى المقاومة ضد الأمراض النباتية والحشرات . بالإضافة الى ذلك تـــم التطويـــر الســـريع لأصناف نباتية ذات صفات مرغوبة أخرى (الشكل ٩-١) بما فيها برامج لزيادة الإنتاجيـــة فى المحاصيل الحقلية والحصول على وسائل جديدة تستطيع التخلص من التلـــوث البيئـــى بالمواد الكيميائية . إن الإنتاج والزراعة على المستوى الواسع للعديد من هـــذه المحــاصيل تقدم دليلا واضحاً عن التحسين البيئى وزيادة العائدات بكل المقاييس المعروفـــة فـــى هـــذا الشأن. بالرغم من أن هذه الاستراتيجيات خلقت نوع من الموائمة فيما يتعلق باســـتخدامات الهندسة الوراثية لحل المشاكل التى تجابه الإنتاج الزراعى إلا أنه أصبح من الواضح ان من بين الأسباب التى تقلل وتعدل من الفوائد المخاطر البيئية الخطيرة .



شكل (٩-١) : الصفات الفيتولوجية للنباتات المتحولة وراثيا والتى وزعت فى ٢٧٤٧ حقل تجارب فـــى أمريكا بما بين ١٩٨٧ وسبتمبر ١٩٩٦ . النسبة المئوية فى كل مرتبة كـــانت : التحمـــل لمبيدات الحشائش ٢٧,٤% ، المقاومة للفطريات ٣,٦% ، المقاومة للفيروســـات ١٠,٦% ، المقاومة للحشـــرات ٢٤,٤% ، جـــودة المنتـــج ٢٦,٥% ، صفـــات أخـــرى ٧,٥% (مأخوذة من USDA / APHJS) .

الآن تقوم العديد من المنظمات الحكومية بتنظيم التعامل مع منتجـــات التكنولوجيـــا الحيوية وجميعها تؤكد على أن إدخال هذه الكائنات الحية لن يحدث تأثيرات عكسية علـــى صحة الإنسان والإنتاج الزراعى أو الثبات البيئى . مع كل من هذه النواحى والاهتمامـــات فان الهدف العام للهيئات الحكومية يتمثل فى إحداث توازن بين التأثيرات المعاكسة فى مقابل الفوائد المقترحة والتى تؤدى الى مخرجات تشريعية تشمل الاتجار . فى هذا المقام سنحاول إلقاء الضوء عن بعض المخاطر المؤثرة المرتبطة بإطلاق النباتات المتحولة وراثيـــا فـــى الأسواق مع التركيز على مختلف النواحى الايكولوجية والتى تنعكس تأثيراتها على بعـــض الأمور غير الزراعية . فى مناقشاتها سوف لا نلقى بالا لبعـــض الصفـــات فـــى النباتـــات المحولة وراثيا والتى قد تغير بشكل مباشر أو غير مباشر للبيئات الطبيعية .

الخطر البيئى الذى يغطى على كل الاهتمامات يتأتى من خطر أن الجين المســـئول عن مقاومة النباتات لمبيد الحشائش أو الآفة قد يزيـــد مـــن حشائشـــية الأنـــواع النباتيـــة Weediness سواء من النبات المتحول أو الحشيشة التى تكتسب الجيـــن المقـــدم خـــلال التهجين مع النبات المحول وراثيا . من الأخطار الأخرى التى تظهر فى الأفق أن وجـــود النباتات المتحولة وراثيا سوف يزيد من عنف الآفات النباتية المحلية وتخلق فيروسات جديدة وتحرر توكسينات فى التربة بعد الحصاد . استعراض ونقص العديد من هذه المخـــاطر أدت الى بروز فكرتان متداخلتان . الأولى أن حركة الكائنات الحية بيـــن المنـــاطق الزراعيـــة والطبيعية تعتبر الأساس والقاعدة وليست استثناء . عندما يحدث ذلك فـــان التغيـــرات فـــى ديناميكية المجتمع فى منطق ما سوف تنعكس على مناطق أخرى . الثـــانى أن الديناميكيـــة البيئية للمجتمعات ، الكائنات الدقيقة الموجودة ، النباتات والحيوانات فى منطقة ما يمكـــن أن تتغير بشكل ملحوظ بواسطة التشويش من جانب عضو آخر فى المجتمع . مثال ذلك أنه إذا قتلت حشرة آكلة للعشب بواسطة النبات المحول وراثيا فان المفترسات التى تتغذى على هذا النبات قد يحدث خفض سريع فى تعداد هذه الأحياء النافعة . هذه التغيرات فى الوفرة تؤثـــر بشكل كبير على نوع النباتات البرية التى تستطيع البقاء فى المساحات المجاورة .

بالرغم من أن هذه التأثيرات الخطيرة يصعب التنبؤ بها بشكل دقيـــق يصبـــح مـــن الأهمية التحديد عن ماهيتها وإمكانية حدوثها بسبب الأنشطة الآدميـــة . كمـــا حـــدث فـــى السنوات الأولى من استخدام الددت فان الاطلاق الحالى لبعض صـــور الكائنـــات الحيـــة المتحولة وراثيا قد تبدو فكرة عظيمة خالية من أية تتابعات خطيرة ولكن سوف تؤدى بعض النباتات المتحولة لظهور حوادث تسفر عن تغيرات بيئية غير مقصودة بل غـــير مطلوبـــة أصلا . فى هذا المقام سوف نحاول تلخيص النتائج التى تحصل عليها من البحوث البيئيـــة والنقد الذى ينادى بان المخاطر البيئية للنباتات المهندسة وراثيا أمر واقـــع وأن اختيـــارات

الإدارة المناسبة لمجابهة هذه التأثيرات محدودة . سنشير الى مجهودات وضع الدلائل الخاصة بتقييم مخاطر هذه التكنولوجيات المتقدمة . إن قرار استخدام النباتات المهندسة وراثيا يجب أن يبنى على أساس تقييم التوازن بين كلا المخاطر والفوائد على البيئة وكذلك المخاطر والفوائد على صحة الإنسان والنواحى الاقتصادية .

مخاطر الحشائش Weeds Risks

من أكثر المناقشات التى تناولت المخاطر البيئية للنبات المهندس وراثيا ما يفيد من أن إضافة جين إضافي قد يؤدى الى إنتاج محصول ينتمى للحشائش خاصة عندما تقوم الحشيشة الناتجة بغزو المساحات الطبيعية وغير الزراعية (Jiedje وآخرون ، ١٩٨٩ ، Willamson ، ١٩٩٤) . الجينات المنقولة التى قد تجعل من المحاصيل حشائش هى نفسها التى تزيد من لياقة النباتات مثل تلك التى تحقق المقاومة للآفات ومبيدات الحشائش والاجهادات البيئية . إن تقريز المخاطر المؤثرة للمحاصيل المتحولة وراثيا مع الجينات المنقولة يكون من المفيد تحديد الأهمية الاختيارية للآفات ومبيدات الحشائش والاجهادات البيئية فى الأوساط غير الزراعية (Schmitt and Linder ، ١٩٩٤) . بسبب أن البيئات الطبيعية خالية نسبيا من مبيدات الحشائش ومنتجات المخلفات السامة فانه يصبح من الواضح أن المحصول المهندس وراثيا لمقاومة مبيد الحشائش أو تحمل المعادن لا يستحب لإنتاج حشائش تنتشر وتسود فى خارج المساحات المزروعة والأراضى اليابسة . هذه المحاصيل المحولة جينيا والتى صممت خصيصا لتقليل أو التخلص من كميات الكيميائيات فى البيئة تمثل مخاطر قليلة على البيئات الطبيعية كما أنها تعمل كنماذج لتقويم المخاطر من النباتات المتحولة وراثيا (Crawley وآخرون ، ١٩٩٣ ، Bergelson وآخرون ، ١٩٩٦ ، Mikkelsen وآخرون ، ١٩٩٦) .

الخطر النسبى لتقديم أقسام أخرى من جينات التحول يمكن أن تمشى على نفس النسق بتعريف العوامل التى تتحدى البقاء والتكاثر والحكم على أنه بالتغلب على هذه التحديات تسمح للنبات باتساع مداه الجغرافى . الأرز على سبيل المثال قد يغزو مصبات الأنهار إذا تحول وراثيا بجين التحول الخاص بتحمل الملوحة (Tiedje وآخرون ، ١٩٨٩) لسوء الحظ فان التوصل الى تنبؤات دقيقة من خلال هذه الطرق تتطلب بيانات تفصيلية عن الأهمية النسبية للممرضات وآكلات النباتات والعوامل البيئية فى تحديد وانتشار أفراد الأنواع النباتية . هذه المعلومة غير متوفرة حتى مع أكثر النباتات التى درست باستفاضة (Williamson ، ١٩٩٤) . يحاول البحاث وهيئات ومكاتب التشريع الحكومية فى الوقت الراهن جمع هذه البيانات على محاصيل معنية والتى تم هندستها وراثيا بهدف تحسين

الطرق الموجودة للتنبؤ بما إذا كانت جينات المقاومة تزيد الإنتاجية المحصولية (هذا هو هدف مجهودات التكنولوجيا الحيوية) وتمكن النبات من غزو مناطق أخرى خارج نطاق تواجده الجغرافى .

الصفات الوراثية للمحصول سوف تؤثر كذلك على احتمالات حدوث مخاطر من تحول المحصول الى حشيشة عندما يعدل وراثيا . المعلومات المتعلقة بالمحصول ذات أهمية خاصة للتنبؤ بالمخاطر بسبب أن تأثيرات خلق الحشائش قد ترتبط بعدد السنوات التى مرت منذ ظهور واستقرار المحصول محليا . المحاصيل ذات الأصول الحديثة يتوقع أن تمثل مورث كبير لمخاطر الحشيشة بسبب قلة الصفات الحشائشية الأصلية (مثل القابلية أو المقدرة على نشر البذور) . والتى تخلص منها من خلال التربية الاختيارية . بالإضافة الى ذلك فان النوع التى استوطنت حديثا يفضل ويستحب أن توجد كمجاميع خارج نطاق الحقول الزراعية . عباد الشمس والفراولة والكانولا أمثلة لهذه المحاصيل . مجاميع النباتات الشرسة عندما توجد فى منطقة قريبة من الزراعات الحقلية يمكن أن تستقبل بسهولة الجينات المتحولة للمحاصيل عندما تتلقح بحبوب لقاح المحصول . حتى عندما لا توجد أنواع المحاصيل كمجاميع شرسة فأنها قد تكون قريبة من الأقارب النامية بالقرب منها . يمكن أن يحدث التهجين بين الأنواع النباتية نتيجة للتلقيح الخلطى والهجن من التلقيح المتتابع للأقارب البرية تسمح بالجين الناقل بالحركة فى القرين . هذه العملية تسمى إدخال المورثات introgression وقد سجلت فى حركة الجينات من المحصول براسيكا نابوس الى القرين القريب براسيكارابا (Mikkelsen وآخرون ، ١٩٩٦) .

انتقال أو نقل بعض الجينات الانتقالية من المحاصيل الى أقربائها غير مطلوبة لسببين :

الأول : يتمثل فى أنه إذا كان النوع المستقبل حشيشة زراعية بالفعل أو حشيشة فى المناطق الطبيعية غير المزروعة فان الهجين الناتج قد يكتسب الصفات التى تزيد من سلوكه الحشائشي أو من المدى الجغرافي له . بالرغم من أن الهجين الأولى بين المحصول والحشيشة ذات تاريخ حياة ضخم وصفات فينولوجية ورثت من المحصول الأساسي فإن استمرار إدخال المورثات للجين الناقل فى الأنواع الشرسة سوف تؤدى إلى زيادة فقد اللالليلات الممنوحة من المحصول الأب الأولى . فى هذا السبيل فان الجين الناقل سوف يوجد بشكل اكسيدوفوثر داخل الخلفية الوراثية لأنواع الحشائش وأن هذه الكائنات الخرافية غير المتعددة قد تكون أكثر حشائشية عنه فى حالة المحصول أو الحشيشة الأصلية . إن تتابع الحوادث سوف تتشابه مع تلك التى لوحظت فى حالة إدخال مورثات الجينات من بنجر السكر المزروع وغير المهندس وراثيا فى أنواع بنجر متوافقة جنسيا والتى تعتبر

حشائش بالقرب من الزراعات الحقلية (Boudry وآخرون ، ١٩٩٣) . بالرغم من أن الهجين الابتدائى بين المحصول المهندس وراثيا والحشائشى القريب نسبا يكون متوقعا استمراره فى المعيشة دون اقتدار فى الأماكن غير الزراعية (Linder and Schmitt ، ١٩٩٤) . فان البحث الحديث الذى أجراه Mikkelsen وآخرون ، ١٩٩٦ أوضح جزء صغير ولكنه مقاس من الهجين أو النسل المهندس وراثيا يشابه ويتماثل بقوة مع الأب الحشائشى فى اتجاه العديد من الصفات الفينولوجية المعروفة . لذلك فان استمرار معيشة وتكاثر الهجين المهندسة وراثيا قد تمثل مخاطر إيكولوجية يجب أن تؤخذ فى الاعتبار قبل زراعة المحاصيل المهندسة وراثيا بالقرب من الأصناف المتوافقة جنسياً .

الثانى : يتمل فى أنه إذا كانت الميزة الاختيارية التى تحققت فى النبات المتحول جينيا كبيرة فان تثبيت الجين المنقول فى مجموع الحشيشة المستقبلية قد يكون سريعا بما فيه الكفاية كى يسبب خفض فى التباين الوراثى عند الموضع المرتبط بمكان إدخال الجين المرغوب (Kaplan وآخرون ، ١٩٨٩) . هذا التأثير على وجه الخصوص قد يكون دراميا إذا امكن تخفيض المعدلات الفعالة من الدمج ومثال ذلك فى النوع ذات المعدلات الكبيرة المؤثرة فى الذاتية . إذا كانت الحشيشة المستقبلة نادرة أو اختفت من التواجد فان هذا الفقد فى التباين قد يقلل من مقدرة النوع على التكيف للتغيرات المستقبلية الحيوية وغير الحيوية ومن ثم قد تساهم فى التمييز والتباين المحلى . بعض من الأقارب المحصولية المتوافقة جنسيا ذات أهمية كذلك كمصادر وراثية ومن ثم فان النقص فى التنوع الوراثى داخل هذه المجاميع قد يقلل من الجيرمبلازم المتاح لإدخال مورثات الصفات الجديدة فى الأنواع المحصولية غير المتباينة .

تأثيرات مستوى المجموع للجينات المنقولة الهاربة يمكن أن تمثل من خلال سلاسل من التجارب التى أجريت على أنواع الأسماك المحورة وراثيا . لقد قام Muir وآخرون (١٩٩٦) بتحويل الميداكا medaka مع جين هورمون النمو الإنسانى المشتق بواسطة منشط هورمون النمو فى سلمون المحيط الأطلنطى . لقد وجد أن الميداكا المحورة وراثيا تعودت على الزيادة الدرامية فى معدل هورمون الحداثة ولكنها تعانى كذلك من نقص ٤٩% فى حيوية صغار السمك . لقد تمكن البحاث من التنبؤ من خلال النماذج الرياضية أنهُ إذا أمكن نقل النمو المبكر السريع الى النضج المبكر فان الجين المنقول يمكن أن يثبت بسرعة فى المجاميع المحتوية على الأفراد المهندسة وغير المهندسة وراثيا بالرغم من النقص الشديد فى الحيوية . بالإضافة الى ذلك فان الحمل الوراثى الذى يقع على المجموع يجب أن يدفع السمك للتمييز خلال ٢٨ جيل بالرغم من الانتخاب القوى لنشر الجين المرغوب . لقد أدى هذا المثال الى الاقتراح بأن هروب الجينات الانتقالية المسئولة عن تحقيق ميزة

اختيارية خاصة للأفراد قد تسبب انتخاب سريع نحو الهروب والمغـادرة ومـن ثـم فـان تأثيرات الجين المنقول على ديناميكية مجموع الأسماك قد يكون قاتلاً .

بعض المخاطر الايكولوجية لهروب الجينات المنقولـة يمكـن أن نسيطر عليـها ونحددها من خلال التقدم فى تكنولوجيا نقل الجينات نفسها . مثال ذلك أنه فى الإمكان منـع هروب المحاصيل المهندسة وراثيا من خلال التحكم فى الخصوبة التى تمنع مقـدرة حبـة اللقاح أو/و البيضة من أداء وظيفتها عندما يكون الفرد ذات ازدواج نصفى للجين النـاقل . مع هذا البناء فان انسياب حبوب اللقاح من المحاصيل المهندسة وراثيا سوف تـؤدى الـى هجن عقيمة . الاعتماد على هذه الاستراتيجية يتطلب ثقة فى أن الطفرات أبدا فعالية تراكيب الخصوبة هذه وتنتج هجين خصب . بالإضافة الى ذلك فان حوادث الدمج يمكن أن تكسـر الرابطة الخاصة بالجين الناقل للمقاومة وكذلك جين عدم الخصوبة مما يؤدى الى إنتاج عـدد قليل من حبوب اللقاح والبويضات التى تعانى من كيان عدم الخصوبة . هذه العيوب حقيقيـة كذلك فى كيانات الانتحار والتى وحتى وقتنا هذا قد استخدمت للبكتريـا المهندسـة وراثيـا والفطريات المتحولة (Knudsen وآخرون ، ١٩٩٥) . كيانات الانتحار تبنى على جينات الموت من إيشيريشياكولاى التى توجه نحو نقل البلازميد (Molin وآخرون ، ١٩٩٣) . من الاستراتيجيات الجزيئية الأخرى ما يتمثل فى تصميـم الجينـات المنقولـة الخاصـة بالتحول التى يعبر عنها فقط عندما تنشط بواسطة الاستخدام الخارجى للمركب الكيميـائى . بسبب أن كيميائيات التحفيز هذه غير موجودة فى المناطق غير الزراعيـة فـان هـروب المحاصيل المحورة وراثيا أو جينات النقل فى المجموع الطبيعى لن يسبب أى خطر حقيقى.

إن المخزون الكبير من سلالات الأجروباكتيريوم توميناسيس فى معامل البيولوجيـا الجزيئية فى النباتات تمثل جهد واقتدار لطرق أكثر مباشرة مـن خلالـه يمكـن لأنـواع الحشائش الحصول على جينات غريبة . بالرغم من أن هذه السلالات تحتوى فـى العـادة على بلازميدات Tl عديمة الأذرع فقط فان تسرب هذه المخزونات سـوف يـؤدى الـى تعرض كبير الاحتمال للنباتات البرية الى بكتريا أجروبـاكتيريوم التـى تعـول الجينـات الوهمية. البحاث الذين يشتركون فى إنتاج النباتات المتحولة وراثيا يعلمون أن التحول حتـى تحت الظروف النموذجية نادرة الحدوث ولذلك فان الخطر الحقيقـى مـن هـذا الانتشـار العرضى قد يكون منخفض جداً . بسبب أن بكتريا الأجروباكتيريوم تداوم المعيشة علـى او فى النباتات المتحولة فان نشر البكتريا فى البيئات الطبيعية من خلال التجارب الحقلية قـد تزيد من تكرارات تعرض الأنواع البرية الى مقدرة التحول للبكتريا . لكى نقـرر إمكانيـة إنتاج الحشائش المهندسة وراثيا بهذه الوسائل يصبح من الأهمية نقدر لأى مدى تستطيع هذه السلالات عديمة الأذرع أن تعيش فى التربة وما إذا كانت تستطيع تبادل البلازميدات مـع

بكتريا أخرى . تسجيلات تبادل البلازميد بين سلالات البكتريا المختلفة توضح ان خطر هذه البلازميدات عديمة الأذرع يتمثل في إدخالها في السلالات العنيفة أو ذات الأذرع (Tirodimos وآخرون ، ١٩٩٣ ، Daane وآخرون ، ١٩٩٦) . كل هذه الاهتمامات المذكورة أعلاه يمكن أن تشير بشكل جزئى الى شمول جينات الانتحار (Molin وآخرون ، ١٩٩٣) . فى الدنا الكروموسومى والبلازميد T1 لسلالات الأجروباكتيرم توميفيسانس التى استخدمت فى البيولوجيا الجزيئية .

التنبؤ بالتأثيرات الايكولوجية لهروب الجينات المنقولة

السؤال المطروح هو كيف يمكن للمخاطر الايكولوجية المرتبطة بالمحاصيل المهندسة وراثيا أن يتوقع حدوثها ؟ نحن فى حاجة للتنبؤ بالتأثير الايكولوجى للجين المقدم فى المحصول نفسه وفى أى نوع من الحشائش قادر على التهجين مع المحصول المهندس وراثيا . لقد تم تحدى هذه التجارب من خلال الطرق حيث أن العديد من مصادر التباين التى تؤثر على شدة الخطر يجب أن تقدر . فى هذا المقام سوف نقوم بوصف مصادر التباين الواجب أخذها فى الاعتبار عند محاولة التنبؤ بتأثيرات اللياقة للجينات المقدمة . لقد تمت مناقشة التجارب الحديثة التى تفحص تأثيرات اللياقة للنبات المهندس وراثيا لمقاومة مبيد الحشائش وكذلك الجين المقاوم للمضاد الحيوى فى الأرابيدوبسيس ثاليانا (Bergelson وآخرون ، ١٩٩٦) . فى النهاية تمت الاستفادة من بيانات اللياقة فى التنبؤ ظاهرة مستوى الثنائى المجموع حيث ناقشت :

أ – ما إذا كانت الجينات الانتقالية سوف تستمر للتثبيت داخل المجموع .

ب– ما إذا كان معدل نمو المجاميع المحورة وراثيا سوف تكون أكبر من المجاميع غير المهندسة وراثيا .

المصدر الهام الأول للتباين فى التنبؤ بتأثيرات اللياقة للجين المقدم ترجع الى الطوز الوراثى والذى تم فيه إدخال المورثات الجينية وهذا ما يطلق عليه " تأثير الخلفية الوراثية " لقد أوضحت العديد من الدراسات المرجعية التى تضمنت التربية التقليدية أن تأثيرات اللياقة للجينات التى أدخلت كمورثات فى خطوط الوراثية المختلفة يمكن أن تختلف بشكل فظيع . مثال ذلك أن الدراسات التى تقارن التأثير النسبى للياقة للخطوط المشابهة القريبة مع أو بدون جين إدخال المورثات الخاصة بالمقاومة أظهرت أنه فى غالبية الدراسات فان الجين المقدم قد يحدث تأثير لياقة موجب أو سالب اعتماداً على الخلفية الوراثية التى تم الإدخال فيها . نفس التباين فى تفاصيل كيف أن جينات المقاومة المدخلة تؤثر على مورفولوجية وفينولوجية ولياقة صنفان من الخس أشارت الى التأثيرات الكيفية المختلفة لزوج من اثنين

من جينات المقاومة المرتبطة فى صنفى الخس (Bergelson ، ١٩٩٤-بى) . بالرغم من أن صنفى الخس يعانيان من نقص محسوس فى اللياقة المرتبطة بالجينات المقدمة (عندما تنمو فى غياب الأعداء الطبيعية) فان " تكلفة المقاومة " ترجع الى التأخير الفينولوجي ونقص الوزن الخضرى فى واحد من الصنفين ولكنه كان يرجع الى اختلافات فى البناء فى الصنف الآخر . حيث أن نفس الجينات تؤدى الى اختلافات واسعة فى التأثيرات المورفولوجية فى الصنفين فان الارتداد الايكولوجي لتعبير هذه الجينات قد يكون مختلفا . لذلك يكون من الأهمية بمكان قياس تأثيرات الجين المقدم فى الخلفية الوراثية المناسبة بشكل نموذجى باستخدام أفراد من المجموع المحلى لكل نوع من أنواع الحشائش التى يستجد أن تكتسب الجين . مثل هذا البروتوكول سوف يميز التحول أو التكيف المحلى للأنواع النباتية للبيئات التى توجد فيها كما ذكر فى العديد من الدراسات المرجعية (Harper ، ١٩٧٩ ، شميدت وأنتونوفيكس عام ١٩٨٦) .

المصدر الثانى للتباين والواجب الاعتبار فى محاولات التنبؤ بتأثير الجين المقدم يتمثل فى الاختلافات التى ترجع الى الوضع الكروموسومى الذى سوف يزرع فيه الجين وهذا ما يطلق عليه " التأثيرات الموضعية Position effects " . بالتأثيرات الموضعية . لذلك نتوقع اختلافات فى التأثيرات الايكولوجية للجينات المزروعة فيما بين خطوط الهندسة الوراثية المشتقة فى نفس الخلفية الوراثية . ليس من المستغرب أن الخدمات الخاصة بالكشف عن صحة الحيوان والنبات للتوثيق الخاص بالنواحى التجارية يشير الى اختلافات وتباين فى أداء خطوط الإنتاج المهندسة وراثيا ومن ثم يصبح من الأهمية معرفة هذه التباينات عند تصميم التجارب الحقلية .

مع أخذ هذه النقاط فى الاعتبار تم تصميم تجارب حقلية للتقدير الكمى لتأثيرات اللياقة المرتبطة بالجين المزروع المسئول عن المقاومة لمبيد الحشائش كلوروسلفيرون فى A.thaliana . هناك ثلاثة نواحى فى هذا التصميم التجريبى الذى يميز هذه التجارب عن التجارب السابقة :

١-لقد تم إجراء تجارب حقلية على الحشائش المهندسة وراثيا بشكل مباشر . فى هذا السبيل كان فى الإمكان القياس المباشر لتأثيرات اللياقة للجين المزروع فى الحشيشة بدلا من تحديده من تجارب اخرى على المحاصيل .

٢-لقد تم استخدام مجموعة من أربعة خطوط مهندسة وراثيا مستقلة عن بعضها البعض لمضاعفة وتكرار مواقع الزرع العبورى .

٣-تم استخدام مجموعة من ثلاثة خطوط مستقلة لناقل المقاومة المحور وراثيا لتمييز التأثيرات اللياقة التى ترجع الى أجزاء أخرى من البلازميد المزروع

(مثال ذلك التكاليف المعنوية المرتبطة بالمعلمات الاختيارية على البلازميد) . المكونين الأوليين للتصميم التجريبى ضرورية للتنبؤ بمآل الجين المنقـــول فـــى مجموع الحشيشة أما المكون الثالث ضرورى للتنبؤ بسلوكه فى الوضع الـــذى فيه أصبحت جينات المقاومة غير مرتبطة ببقية الجينات المرتبطة التى تحمـــل البلازميد .

لبداية هذه التجارب تم تحويل نباتات A.thaliann بواحد مـــن أى البلازميـدات . خطوط ناقل المكافحة "Vector – control lines" تم خلقها مع الناقل p-Bin19 الـــذى يحتوى على المعلم الاختيارى npt II . النباتات المقاومة والمهندسة وراثيـــا خلقـــت مـــع PGH8 وهو بلازميد مشتق من pBin 19 والذى فيه تم إدخال جين المقاومة . المحـــولات الأساسية تم تعريفها لجيلين من العبور الرجعى backcrossing لكى يزيل الطفرات الخلفية متبوعا بجيل من الذاتية (الشكل ٩-٢) . لذلك فانه لكل محول transformant تم اشـــتقاق حزمة من البذور متجانسة التزاوج للمقاومة أو متجانسة للحساسية (يطلق عليها منعـــزلات عديمة القيمة null-segregants) . المقارنة بين المنعزلات عديمة القيمة ونباتات المقارنة سوف تعطى طفرات قد تنعزل فى الخلفية الوراثية حتى بعد العبور الرجعـــى . الخطـــوط الناتجة تنمى عندئذ تحت الظروف الحقلية ويتم تحديد بقاء ومعيشة ولياقة كل نبات .

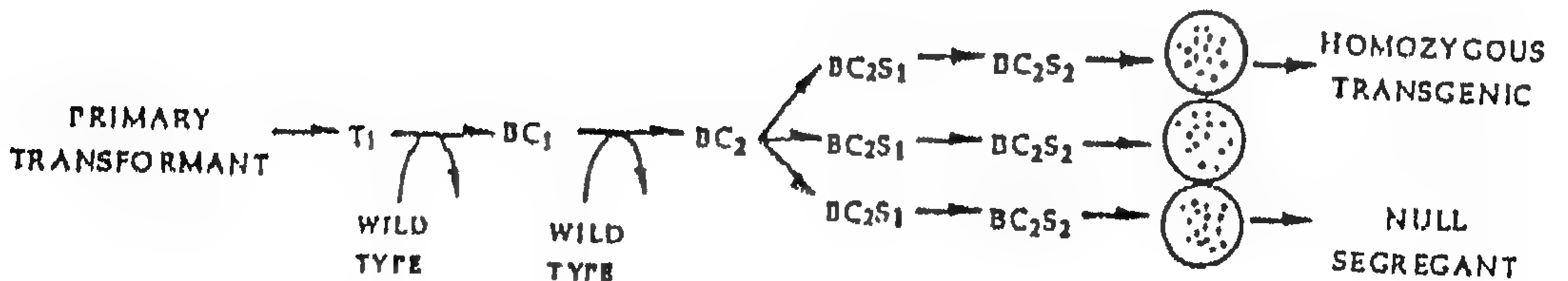
تقوم الآن بزراعة هذه الخطوط عبر سنوات عديدة وتحت ظروف متباينة بيئيا وقـــد وجد نقص كبير فى اللياقة مرتبطة بتكـــامل بلازميـــد PGH8 فـــى الخطـــوط المهندســـة وراثيا. هذه النتيجة تكون ثابتة عبر تكرارات خطوط الإنتاج المتحولة مثال ذلك أنه فى عام ١٩٩٦ تراوحت التكاليف الملحوظة للمقاومة من ٢٣ – ٥١% (شكل ٩-٣) . لقد أدت هـذه النتيجة الى الاقتراح بأن التأثيرات الموضعية تكون صغيرة بالنسبة الى التأثيرات المباشـــرة للجين المزروع . بالإضافة الى ذلك فان خطوط ناقل المكافحة أكدت أن التكاليف المرتبطـــة بتكامل بلازميد PGH8 ترجع الى جين المقاومة نفسه ولكن ليست هناك تكاليف مرتبطـــة بتكامل الناقلات pBin 19 .

مثل هذه النتائج تعطى راحة لهؤلاء المشتغلون فى تقييم مخاطر التكنولوجيا الحيوية. التكاليف الكبيرة للمقاومة تفترض لتقليل المخاطر من النباتات التى تحتوى علـــى جينـــات المقاومة ستكون غازية . لقد أفترض أن إضافة جينات إضافية تقلل تنافس الكـــائن الحـــي بسبب إضافة تكاليف إضافية لتخليق الأحماض الأمينية والبروتينيات ... العديد من الكائنات الحية المهندسة وراثيا سوف تكون أقل لياقة من الكائن الأب . التفسير بسيط فى أن الطاقـــة التى تتحول الى دفاع سوف تقلل من الكفاءة التناسلية للنباتات وهذا سوف يقلل بالتبعية مـــن معدلات نمو المجموع . لذلك توجد ثلاثة مشاكل رئيسية مع هذا الواقع المقبول :

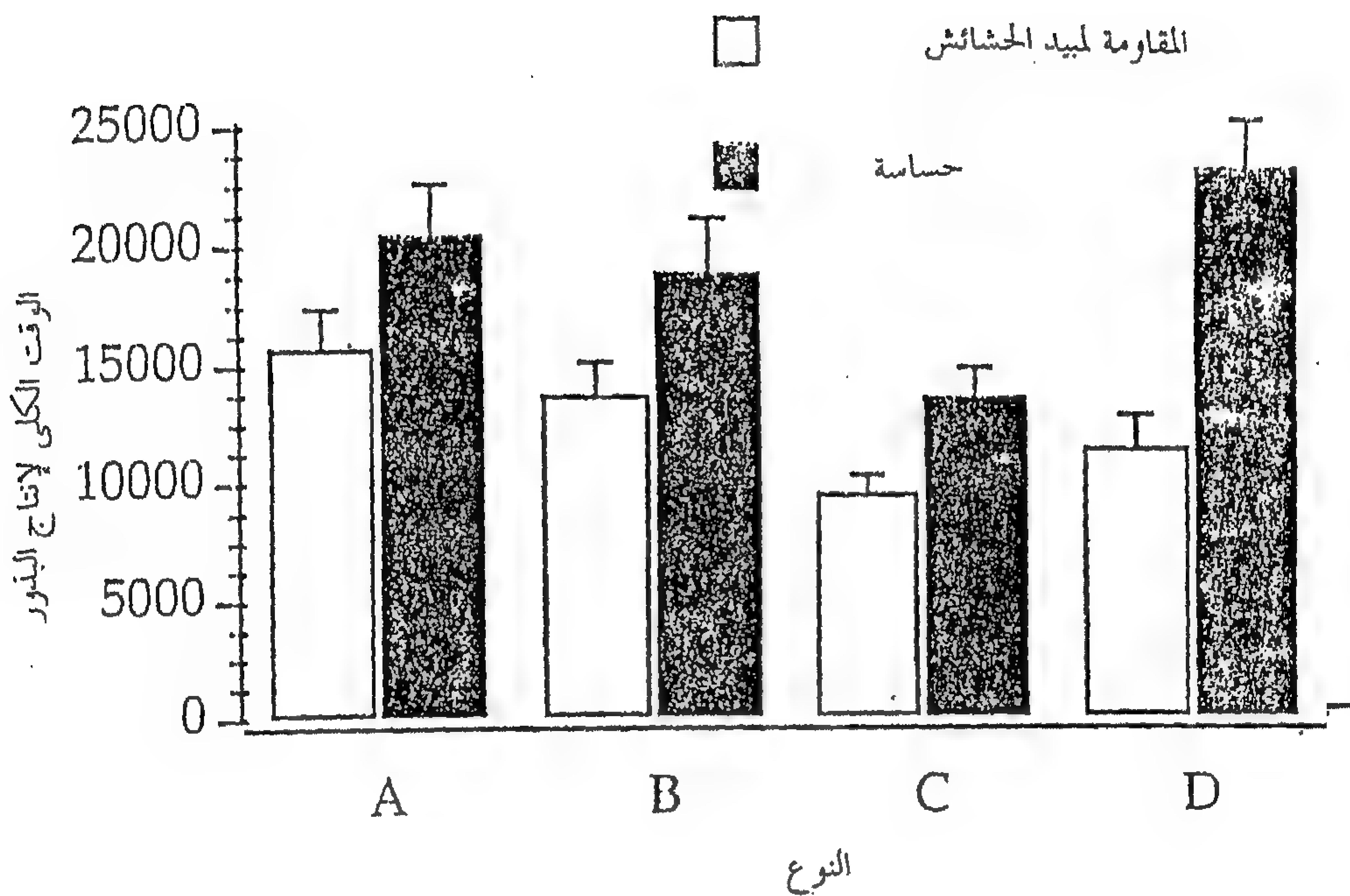
١-تكاليف المقاومة Costs of resistance وهى لا توجد دائما وإذا وجدت تكون فى الغالب صغيرة جدا . مثال ذلك أن حصر ٨٨ ورقة علمية نشرت عن تكاليف المقاومة فى النباتات التى ربيت تقليديا أدى بالباحث بيرجلسون وبرانجتون (١٩٩٦) الى القول بأن تكاليف المقاومة كانت ذات قيمة فى ٥٠% من الدراسات المنشورة . واتضح أن المتوسط الخاص بتكاليف المقاومة يقابل ٧% خفض فى اللياقة .

٢-حتى لو كانت تكاليف المقاومة موجودة فى البداية فأنها سرعان ما تنحسر فى مواجهة الانتخاب الطبيعى أو الصناعة (Lenski and Vguyen ، ١٩٨٨).

٣-يبنى هذا النقد على افتراض قوى أن التغيرات فى التناسل تترجم مباشرة الى تغيرات فى كفاءة الغزو . من المثير للدهشة أن هذا الارتباط بين ناتج التكاثر ومعدلات نمو المجموع نادراً ما تعرضت للاختبار . فى أحد الاختبارات على هذه العلاقة قام Bergalson (١٩٩٤-أ) بزراعة قطع تجريبية بنباتات A.thaliana مقاومة وأخرى حساسة لمبيد الحشائش كلوروسلفيورون . السؤال المطروح يتمثل فيما إذا كانت تكاليف اللياقة الكبيرة المرتبطة مع المقاومة سوف تؤدى الى نقص مقابل فى معدلات نمو المجموع عبر الأجيال . الإجابة كانت مدوية " لا " حيث لم يحدث عدم تأثر تام لمعدلات نمو المجموع بواسطة التغيرات الملحوظة فى التناسل . هذه النتائج تؤكد الحاجة الى قياس كفاءة الغزو مباشرة وليس قياس أداء كل فرد .



شكل (٩-٢) : برنامج التربية المستخدم لإنتاج خطوط A.thaliana . كل محول أصلى (خلق فى الخلفية الحساسة / كولومبيا) تم تهجين عبوريا لجيلين للتخلص من الطفرات الضارة خلال التحول . الناتج BC2 تم تكراره لخلق أقارب متجانسة للمنعزلات المتميزة الخاصة بالجينات المنقولة والمنعزلات عديمة القيمة المتجانسة لغياب الجينات المنقولة . أية طفرات باقية غير مستحبة سوف تنعزل بالتساوى فى هاتين المجموعتين والتى حللت كأزواج فى نظام إحصائى . المتحولات المحتوية على مدخلات عند موقع منفرد فقط هى التى استخدمت .



شكل (٩-٣) : الوقت الكلى لإنتاج التقاوى الناتجة من الانعزالات المقاومة والحساسة المشتقة من كل من الأربعة أفراد مستقلة من النباتات المتحولة وراثيا أ.ثاليانا (كولومبيا طرز بيئى A-B) . لقد تم تحويل النباتات مع الناقل PGHB المسئول عن المقاومة لمبيد الحشائش كلوروسلفيورون والمضاد الحيوى كاناميسين . حدث ٣٤% نقص شامل فى لياقة خطوط الإنتاج بالنسبة لأقرانها الحساسة .

التأثيرات الايكولوجية للآفات والمسببات المرضية المقاومة

من الأمور التى لاقت الكثير من الاهتمام التأكد من إمكانية ان المحاصيل المهندسة وراثيا بصفات المقاومة قد تزيد بشكل مباشر من العنفوانية أو اتساع المدى العوائلى للآفات النباتية . إذا حدث ذلك فان النباتات المهندسة وراثيا سوف لا تحمى طويلا بسبب أن الآفات سوف تصبح منيعة لتوكسيناتها . هذا مفهوم مفاده أن النباتات المهندسة وراثيا قد تغيرت بالجينات التى تشفر التوكسينات من الأنواع النباتية الأخرى . فى هذا المقام فان الآفات التى أصبحت مقاومة لا تتغلب فقط على دفاعات المحصول ولكن تستفيد من زيادة المقاومة للنباتات الطبيعية التى تعتمد على نفس التوكسينات للدفاع . لذلك فان نشوء المقاومة لن تغير النباتات البرية فقط ولكن تزيد أيضا من توفر الغذاء للآفات الحشرية . هذه المخاوف ذات أساس راسخ فى التفكير الايكولوجى . لقد اقترح ايرليسن ورافين (١٩٦٤) أن توسيع المدى العوائلى قد ينتج من التذوق العرضى للنباتات غير العائلة بواسطة الطرز الوراثية للحشرة والتى سبق تكيفها للبقاء على هذا العائل الجديد . هناك بعض الأدلة التى تعضد هذه الفرضية . مثال ذلك ما وجده Futuyma وآخرون (١٩٩٣) . من أن بعض مجاميع خنفساء الأوراق التى تملك تباينات وراثية تمكنها من استيطان العوائل غير المرتبطة . بالإضافة الى ذلك فقد اتضح وجود توافق ومقابلة بين كمية التباينات الوراثية الموجودة فى مجموع الخنفساء والتشابه الكيميائى بين أنواع العوائل المرتبطة . لقد عضدت هذه النتائج المقولة التى تنادى بان الاختلافات الوراثية لتحمل كيمياء النبات تفسر على الأقل فى جزء منها المدى العوائلى للخنافس . توسع المدى العوائلى يمكن أن يساهم فى تخصص الحشرة. (Feder وآخرون ، ١٩٨٨) خاصة عندما تزدوج مع سلوكيات التزاوج المعزولة مثل تلك الموجودة فى ذبابة الثمار Rhagoletis والتى تعيش وتتزاوج فقط على ثمار العائل الخاص بها (Prokopy واخرون ، ١٩٧١) . لذلك فان إدخال التوكسينات من الأنواع النباتية غير المزروعة لأنواع المحاصيل سوف يؤدى الى انتشار الآفات على النباتات غير المزروعة وقد يحفز ويساعد من احتمالات التخصص بين الآفات .

السؤال المطروح هو لأى مدى يستجيب أن الآفات التى تظهر مقاومة للنباتات السامة قد تخلق خلال التضاعف او التعديل الوراثى ؟ بالطبع فان كل النباتات تنتج توكسينات طبيعية ومواد طاردة والعديد من الحشرات ومسببات الأمراض النباتية تتغلب على هذه الوسائل الدفاعية ربما من خلال فعل الانتخاب الطبيعى . ثانيا فان الانتشار الواسع للمبيدات قد انحسر ويستمر فى الانحسار بسبب نشوء المقاومة للمبيدات ما بين الآفات . يوجد الآن ما يزيد عن ٥٠٠ نوع من مفصليات الأرجل مقاومة لمبيدات الحشرات ، ١٠٠ نوع من المسببات الفطرية مقاوم للمبيدات الفطرية ، ١٠٠ نوع من الحشائش مقاوم لمبيدات

الحشائش (Fox ، ١٩٩٢) . لذلك فان الأفات قادرة بشكل واضح لتطوير المقاومة كاستجابة للسموم الطبيعية والصناعية ومن ثم تكون قادرة لعمل نفس الشـــىء فـــى الاســـتجابة لأى توكسين يعبر بواسطة النباتات المحولة وراثيا . ما يثير القلق الآن يتمثل فى السرعة التـــى تتم بها ويحدث نشوء للمقاومة . على سبيل المثال فان الباسيلليس ثورينجنيسيز (Bt) حيـــث ان السم البكتيرى لحشرات حرشفية الأجنحة وغمدية الأجنحة تستخدم كمبيدات منذ سـنوات عديدة ولكن أمكن التغلب عليها فى بداية ١٩٥٣ مبكرا بواسطة الفراشة ذات الظهر الماســى فـــى إندونيســيا (Talekar and Shelton ، ١٩٩٣) . حيــث أن اســتخدام هــــذه المستحضرات أصبح أكثر انتشارا فان المقاومة ظهرت بشكل أكبر . يوجد الآن مجاميع من هذه الفراشات فى هاواى والقارة الأمريكية واليابان مقاومة لسمية البكتريا . فى التجـــارب والتى استخدمت فيها أصناف من هجن الأرز مقاومـــة لفطـــر اللفحـــة (Magnaporth grisca) وجد الباحث ليفى أنه فى معظم الحالات يستغرق التغلب على المقاومة للمـــرض من سنتان الى ثلاث سنوات . هذا يرجع ليس فقط لقصر طول مدة جيـــل الفطـــر ولكـــن لاحادية صبغات الجينوم الخاص به وكذلك قدرتها على تخزين التباينات الوراثيـــة (Lyvy واخرون ، ١٩٩٣) . لذلك تشير أسباب كثيرة بل كل الأسباب التى توقع ظهور المقاومـــة فى الافات بشكل سريع للنباتات المهندسة وراثيا على أنها سامة .

الاستراتيجيات التى تخفض من نشوء المقاومة فى الآفات

حيث ان الأفات تميل الى تطوير المقاومة للنباتات المهندسة وراثيا وقد يحدث ذلـــك بسرعة فان البحوث تركز فى تقييم هذا الخطر على سبل وكيفية تخفيض حـــدوث المناعـــة وليس كيفية منعها . لذلك تضطلع المجهودات البحثية نحو إيجاد استراتيجيات تضعف مـــن قوة الانتخاب الطبيعي وهى القوة الدافعة لنشوء المقاومة . من أحد السبل فى خفض نشـــوء المقاومة ما سوف تقلل تعرض الآفات للتوكسين . إذا حدث ذلك فان الآفات الحساسة تستمر فى الحياة والجينات التى هي مسئولة عن الحساسية تبقـــى وتســـتمر ثابتـــة . الملا ذات الأماكن التى تفضل الآفات الحساسة للمعيشة والبقاء يمكن أن تخلق بعدد من الوســـائل . أن خليط من الأصناف النباتية السامة وغير السامة تقدم للآفات الحساسة غذاء أمن فى أى وقت . إن استخدام المخاليط يمكن أن يكون ذات فاعلية خاصة إذا كـــانت الآفـــات ذات مقـــدرة للتمييز بين الصنفين وتجنب النباتات السامة . التجنب ظاهرة معروفة فى الحشرات وبدرجة أقل من مسببات الأمراض . من الأهمية بمكان التمييز بين درجات الخلط حيـــث ثبـــت أن الخلط على المستوى الدقيق يخفض من وبائيات الأمراض بدرجة أكثر نجاح عن المخـــاليط الكبيرة لأن الخلط الدقيق يتداخل مع العدوى من نبات لآخر (Mundt وآخرون ، ١٩٨٦) . من الطرق الأخرى لتزويد ملاذ للأفات الحساسة يتمثل فى استخدام منشطات لا تعبر عن

جين السم بالتتابع خلال النبات ولكن تعبر عن السم عند الحاجة . لقد أوضح Follett على سبيل المثال أن الحشرات التى تهرب من معاملات المبيد الحشرى بالتغذية على الأوراق الصغيرة غير المحمية تحدث المقاومة ببطيء أكثر . المنشطات التى تمكن الحشرات من الهروب من توكسينات النباتات المتحولة قد تحفز وتزيد من إنتاج التوكسين عندما يحدث ضرر وتلف كبير وقد يحتمل ان تكون ذات تخصص بالنسيجية أو تحمي فقط الأنسجة النباتية للنباتات ذات الأهمية الاقتصادية .

من الطرق الأخرى لخفض الانتخاب الطبيعى تجاه المقاومة يتمثل فى تقليل حجم مجموع الآفة قبل فصل الانتخاب الطبيعي . مجاميع الآفات الصغيرة لديها فرصة قليلة كى تملك التباينات الوراثية الضرورية اللازمة لنشوء المقاومة . بالإضافة الى ذلك فان الانجراف الوراثى سوف يؤدى الى فقد الالليلات الجديدة والنادرة فى المجموعات الصغيرة. من الطرق البسيطة لتقليل حجم مجاميع الآفة يتمثل فى إدخال وسائل مكافحة حيوية مثل المفترسات وأشباه الطفيليات . الطرق الأخرى تتمثل فى النشر الداخلى للمحصول المهندس وراثيا مع نباتات عائلة بديلة . مثال ذلك أن الدورة المحصولية تقدم حاجز مؤقت لنشر الآفات . التبديل بمحاصيل غير عائلة مع المحصول المحول ذات الاهتمام يمكن أن يخفض من ثبات الآفات فى الفترة العارضة . عندما تكون الكثافة الابتدائية للآفات مؤشر عن مدة كبر مجموعها على المحاصيل المحولة وراثيا فان هذه الاستراتيجية يمكن أن تخفض بفاعلية الكثافة الابتدائية ومن ثم تقلل من احتمالات نشوء المقاومة . التحميل المحصولى هو نوع آخر من الخلط والتى فيها يتم خلط النباتات السامة والمتحولة وراثيا مع الأنواع غير العوائل . النبات غير العوائل تقدم حاجز لحركة الأفات داخل المحصول ومن ثم تخفض من معدل انتشار ونمو مجموع الآفات . بالإضافة الى ذلك فان التحميل المحصولى يمكن أن يجعل الحقل أقل جذبا للآفات ومن ثم تنخفض معدلات استعمار الآفات . مرة أخرى فان مميزات التحميل واضحة ضد الحشرات أكثر منها مسببات الأمراض النباتية .

الاستراتيجية الثالثة لخفض نشوء المقاومة هو تكثيف شدة الانتخاب الطبيعى ومن ثم دفع الآفات للإنقراض المحلى . هذا الاقتراب يشمل استراتيجيات مثل إنتاج النباتات المهندسة وراثيا فى نفس التوقيت مع الجينات العديدة للسموم (أهراميات الجينات) . هناك مخاطر عالية لزيادة شدة الانتخاب الطبيعى . إذا فشلت الاستراتيجات نحو دفع الآفات للإنقراض فان الآفات سوف تكتسب مقاومة بسرعة جدا . حتى لو نجحت الاستراتيجيات فان الانقراض المحلى قد لا يكون كافيا لحماية المحصول من الآفات إذا كانت تستطيع الهجرة من المساحات المجاورة .

المقارنات بين هذه الاتجاهات الثلاثة ممكنة . العديد من البحاث عملوا مقارنات جيدة وبسيطة بين أمراض الموزايك والدورات المحصولية وأهرامات الجين باستخدام نماذج المحاكاة بالحاسب الآلى . من ناحية التأثيرات فان هذه الطرق تقيم أهمية الكساء الأخضر دون تجانس . الأهرامات الجينية تخلق نباتات تنتج توكسينات بتجانس . الموزايك والدورات الزراعية تقدم عدم تجانس فى المكان والزمن . الطرق الذى يمكن لهذه النماذج أن تعمل بشكل عام يتمثل فى تعقب نشوء الآفات من خلال تعقب التغيرات فى تكرارية حدوث الجينات عند الموضع الذى به الالليلات المسئولة عن الحساسية أو المقاومة لتوكسين خاص . لكل توكسين نباتى (اثنين أخذا فى الاعتبار) يوجد جين مقابل فى الآفة التى تعنى بالأمر . لقد نوقش حقيقة التركيب الوراثى باستفاضة (Simms ، ١٩٩٦) . مع معظم هذه النماذج فان الهدف يتمثل فى تعريف الاستراتيجيات والظروف التى تقلل من معدل التغير فى اليللات الآفة وتكراريتها من الحساسة للمقاومة . العوامل الوراثية التى وجدت تزيد من نشوء المقاومة هى : المعدل العالى لطفرية الآفة وتكرارية الليل المقاومة الابتدائية العالية (Gould ، ١٩٨٦ ، Mundt ، ١٩٩٠ ، ١٩٩١) وسيادة الليلات المقاومة والاختباء فيما بين موضع المقاومة (Cox and Hatchett ، ١٩٨٦) . العوامل الايكولوجية التى وجدت تزيد من معدل نشوء الآفة هى : التحمل الواطى للنبات ضد ضرر الآفة (Follett وآخرون ، ١٩٩٣ ، Winterer ، ١٩٩٥) . ومعدل نمو سريع لمجموع الآفة ، معدلات هجرة عالية للآفة (Winterer وآخرون ، ١٩٩٤) . فى كل هذه الدراسات فان العوامل الوراثية والايكولوجية والتى تحدث تأثيرات أكثر فاعلية (الدورات المحصولية ، الموزايك ، أهرامات الجين) تبطىء من معدل نشوء مقاومة الآفة .

كل هذه الاستراتيجيات قد تنجح فى تأخير نشوء الآفات المقاومة ولكن لا شىء يستطيع منعها . نحن نعرف أنه لا توجد أبحاث منشورة عن التأثير والضرر الناجم من الأفات المقاومة على مجاميع النباتات الطبيعية . مثال ذلك عدم وجود تجارب تقييم الفرصة لدى الأفات التى تكتسب مقاومة للنباتات المزروعة حتى يتسع مداها العوائلى ليشمل نباتات برية جديدة . على نفس المنوال فان تتابع الآفات المقاومة لمفترساتها وطفيلياتها تبقى بدون دراسة . لذلك تكون لدينا حس واضح أن احتمالات نشوء مقاومة للآفات عاليا والاستراتيجيات التى تقوم بإدارتها يمكن أن تؤخر الضرر .

تصنيف أو تناسق المخاطر الايكولوجية الأخرى

إن النظرة الواعية واختبار المخاطر الايكولوجية لنشر الكائنات الحية المحورة وراثيا فى البيئة توضح وجود تحديات كبيرة فى تحقيق الأهداف . ربما يكون من أكثر

التحديات تحديد أى المعايير الايكولوجية هى التى سوف تتأثر حتى يمكن تصميم التجارب بعوامل ملائمة . مثال ذلك ما هى التتابعات البيئية التى يمكن توقعها إذا تم زراعة مئات من الأفدنه بنباتات أرابيدويسيس ثاليانا التى تتحمل الزئبق (Rugh وآخرون ، ١٩٩٦) على موقع ملوث بالزئبق ؟ من أحد المخرجات الممكنة حدوث موت ما بين الحشرات آكلة العشب والتى تستهلك المواد النباتية بتركيزات عالية للزئبق . من المخرجات الأخرى التغيرات السريعة فى الأحياء الدقيقة فى التربة الناتجة من التغيرات الكيميائية عند الموقع . مازال هناك عوامل أخرى تتمثل فى فشل الأعداء الطبيعية للوصول الى آفاتها النباتية بسبب التغيرات فى كيمياء النبات أ. ثاليانا الناتجة من تراكم الزئبق . يمكن أن نشير الى بعض المخاطر الإضافية من خلال تساؤلين :

١-ما هو المصير البيئى للمنتجات ذات الجينات الجديدة ؟ إذا كانت قابلة للانهيار الحيوى ما هى تتابعات المركبات ذات الجين الجديد التى تتواجد خلال مجتمع اللافقاريات والميكروبات التى تقوم بتحليلها ؟ إذا لم تكن قابلة للانهيار الحيوى هل المركبات تكون سامة للتربة أو المصادر المائية ؟ .

٢-هل التحولات الوراثية فى النباتات تتحرك الى جينومات الممرض وإذا حدث ذلك هل النقل يخلق ممرضات أكثر عنفا ؟

السلوك البيئى Environmental fate

حتى بعد حصاد المحصول المحور وراثيا وحرث الحقل فان المنتجات المندمجة التى توجد فى الجذور والسوق قد تثبت فى نواتج التحلل ومن ثم يحتمل أن تؤثر على الكائنات الحية الموجودة فى التربة (Angle ، ١٩٩٤ ، Morra ، ١٩٩٤) . مثال ذلك ما أشار اليه P2lm وآخرون ، ١٩٩٧ من ان توكسين Bt فى أوراق القطن يعبر عن جين الأندوتوكسين الداخلى Bt بثبات لمدة ٥٦ يوم على الأقل بعد الدفن فى التربة . لذلك فان التوسع فى زراعة النبات المتحولة وراثيا قد تتابع بشكل متأخر فى المجتمعات المحلية . عندما تكون الأحياء المتأثرة نافعة للمحاصيل (الفطريات التكافلية ، ديدان الأرض) فان خفض أعدادها قد ينقص من إنتاجية محاصيل المستقبل . بالنسبة للمنتجات المندمجة التى قد تحتفظ بفاعليتها تكون ذائبة فى الماء فان التأثيرات الايكولوجية قد تقع فى المساحات التى تستقبل الانجراف من الموقع الزراعى .

خلق ممرضات جديدة Creation of new pathogens

بالإضافة الى المخاطر الأكثر إثارة لخلق حشائش سوبر فان التوسع فى زراعة المحاصيل المحولة وراثيا قد تنتج أصناف أقل وضوحا ولكنها ذات تأثيرات موجبة متساوية

الشدة فى المساحات القريبة من الحقول الزراعية . من النواحى الهامة واجبة الأخــــذ فـــى الاعتبار إمكانية ان الفيروسات التى تعدى النباتات المحورة وراثيا قد تندمج مــــع تتابعـــات التحول الوراثى لإنتاج فيروسات ذات صفات جديدة مثل توسيع المدى العوائلــــى أو زيـــادة العنفوانية . إذا حدث انتشار لهذه الفيروسات بعيدا من الحقول الزراعية مثل التغير الســـريع فى المرضية فأنها قد تسبب تأثيرات غير مرغوبة داخل مجاميع النباتات الطبيعيـــة (مثـــل اختفاء الأنواع الحساسة) .

REFERENCES

Angle, J.S. (1994). Release of transgenic plants: biodiversity and population-level considerations. Mol. Ecol. 3: 45-50.

Bergelson, J. (1994a). Changes in fecundity do not predict invasiveness: a model study of transgenic plants. Ecology 75: 249-252.

Bergelson, J. (1994b). The effects of genotype and the environment on costs of resistance in lettuce. Amer. Natural 143: 349-359.

Bergelson, J. and Purrington, C.B. (1996). Surveying patterns in the cost of resistance in plants. Amer. Natural. 148: 536-558.

Caprio, M.A. and Tabashnik, B.\E. (1992). Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. J. Econ. Entomol. 85: 611-620.

Coxm, T.S. and Hatchett, J.H. (1986). Genetic model for wheat/Hessian fly (Diptera: Cecidomyiidae) interaction: strategies for deployment of resistance genes in wheat cultivars. Environ. Entomol. 15: 24-31.

Daane, L.L., Molina, J.A.E., Berry, E.C. and Sadowsky, M.J. (1996). Influence of earthworm activity on gene transfer from Pseudomonas fluorescens to indigenous soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 62: 515-521.

Feder, .L., Chilcote, C.A. and Bush, G.L. (1988). Genetic differentiation between sympatric host races of the apple maggot fly Rhagoletis pomonella. Nature 336: 61-64.

Follett, P.A., Gould, F. and Kennedy, G.G. (1995). High-realism model of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) adaptation to permethrin. Environ. entomol. 24: 167-178.

Fox, J.L. (1992). Insect resistance to Bt delta-endotoxin: What it means for farming practices and the environment. Audubon's Bt-Resistance Workshop. National Audubon Society Agriculture Program, Washington, D.C., pp. 1-15.

Gould, F. (1986). Simulation models for predicting durability of insect-resistant germplasm: a deterministic diploid, two locus model. Environ. Entomol. 15: 1-10.

Kaplan, N.L., Hudson, R.r. and Langley, C.H. (1989). The 'Hitchhiking effect" revisited. Genetics 123: 887-899.

Linder, C.R. and Schmitt, J. (1994). Assessing the risk of transgene escape through time and crop-wild hybrid persistence. Mol. Ecol. 3: 23-30.

Morra, M.J. (1994). Assessing the impact of transgenic plant products on soil organisms. Mol. Ecol. 3: 53-55.

Mundt, C.C. (1990). Probability of mutation of multiple virulence and durability of resistance gene pyramids. Phytopathology 80: 221-223.

Mundt, C.C. and Leonard, K.J. (1986). Analysis of factors affecting disease increase and spread in mixtures in immune and suscep-tible plants in computer-simulated epidemics. Phytopathology 76: 832-840.

Palm, C.J., Schaller, D.L., Donegan, K.K. and Seidler, R.J. (1997). Persistence in soil of transgenic plant produced Bacillus thuringiensis var. kurstaki delta-endotoxin. Can. J. Microbiol. 42: 1258-1262.

Purrington, C.B. and Bergelson, J. (1997). Fitness consequences of genetically engineered herbicide and antibiotic resistance in Arabidopsis thaliana. Genetics 145: 807-814.

Rugh, C.L., Wilde, H.D., Stack, N.M., Thompson, D.M. Summers, A.O. and Meagher, R.B. (1996). Mercuric ion reduction and resistance in transgenic Arabidopsis thaliana plants

expressing a modified bacterial mer A gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 3182-3187.

Schmitt, J. and Linder, C.R. (1994). Will escaped transgenes lead to ecological release? Mol. Ecol. 3: 71-74.

Talekar, N.S. and Shelton, A.M. (1993). Biology, ecology and management of diamondback moth. Annu. Rev. Entomol. 38: 275-301.

Thompson, J.N. and Burdon, J.J. (1992). Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. Nature 360: 121-125.

Williamson, M. (1994). Community response to transgenic plant release: predictions from British experience of invasive plants and feral crop ploants. Mol. Ecol. 3: 75=79.

Winterer, J., Klepetka, B., Banks, J. and Kareiva, P. (1994). Crop intensification and increased pest problems: are there strategies for minimizing the vulenrability of rice to pest epidemics? In: P.S. Teng, K.L. Heong and K. Moody (eds.). Rice Pest Science and Management. International Rice Research Institute, Manila.

Wood, R.J. and Mani, G.S. (1981). The effective dominance of resistance genes in relation to the evolution of resistance. Pestic Sci. 12: 573-581.

الباب العاشر
التكنولوجيا الحيوية النباتية والأمان الحيوى

مقدمــــــــــــة :

تلعب التكنولوجيا الحيوية دوراً حيوياً فى المجتمعات الحديثة والتـــى فيـــها تؤثـــر الاكتشافات وتحويراتها المباشرة على الجنس البشرى لأى مجتمع . التكنولوجيـــا الحيويـــة وهى آخر التكنولوجيات الكبرى لهذا القرن لاقت الكثير من الاهتمام . من الناحية العلميـــة أتاحت هذه التكنولوجيا فرصا جديدة للاختراعات حيث نمى الأمل لـــدى صنـــاع القـــرار لمجابهة مشاكل الجوع والصحة والفقر والتطور كما أصبح المنتجين / الفلاحين يتطلعـــون لتحقيق إنتاجية محصولية عالية وفوائد وعائدات مجزية بينما ينتظر المســـتهلكين منتجـــات أفضل ذات أمان عالى . إن تأثير التكنولوجيا الحيوية فى السنوات القادمة سيكون .... كمـــا هو الحال مع الحاسبات الآلية فى الوقت الراهن . لذلك فإن الدول النامية والمتطورة تختلف نظرتهم لهذه التكنولوجيا وفى موضعها السليم من التطور . الطرق المختلفة التـــى ســـوف تؤثر فيها التكنولوجيا الحيوية على التحسين النباتى ومدى المنتجات التى يمكـــن الحصـــول عليها من المزارع سوف نتناولها فى هذا المقام . لقد أصبح من الواضح أن استخدام طـــرق البيولوجيا الجزيئية تقدم فوائد واقتدار وفوائد عالية وتسهل معالجة التحديات الضاغطة التـــى تجابه زيادة الإنتاجية والتنوع الحيوى المتواصل وانحسار الانهيار البيئى من خلال تكـــامل عمليات الإنتاج المبنية على التكنولوجيات الحديثة مع نظم الحياة التقليدية التى تعتمد علـــى الأساسيات الايكولوجية المؤثرة .

الآفاق المثيرة للمنتجات المتقنة والتى نحصل عليها اليوم من البكتريـــا والفطريـــات والسمك والحيوانات ... الخ فى النباتات مازالت تثير العديد مـــن التســـاؤلات الأخلاقيـــة والجمالية والاجتماعية الى جانب إبراز جوانب مرتبطة بالبيئة والإنســـان وأمـــان صحـــة الإنسان . بالرغم من أن أمور الأمان مازالت تثير الغمام عل التكنولوجيا الحيوية فى بدايتها (Brill ، ١٩٨٥ ، Colwell وآخرون ، ١٩٨٥ ، vavis ، ١٩٨٧ ...) فان النقد أثـــار عزم ودفعات جديدة فى الوقت الراهن . الآن قام العديد من المجاميع المهتمة بالتكنولوجيـــا الحيوية بما فهم العلماء ورجالات البيئة والمستهلكين ورجال الدين والهيئات غير الحكوميـــة (Ngos) والتى تدافع عن العديد من التضاربات بإبداء الاهتمام المتزايد حول اســـتخدامات التكنولوجيا الحيوية فى الأمور المختلفة (Krimsky and Wrubel ، ١٩٦٦ ٩ . بينمـــا الفوائد الكبيرة من البيولوجى الجديد للمجتمع واضحة ومؤثرة فانه من الضـــرورى لأخـــذ

عامل الأمان الحيوى فى الاعتبار بعقلانية ونفس الحال مع الأمور والنواحى الأخرى بما يحقق وضع أطارات لتشريعات تجعل من البحث وتطوير المنتجات النافعة فى الطريق السليم بشكل هادىء مع ضرورة استكشاف وضع وحدوث التتابعات غير المطلوبة . فى هذا المقام سوف نحاول استقراء الإصدارات الخاصة بالأمان الحيوى الذى تم تعريفه بالنظر الى اقترابات التكنولوجيا الحيوية كما سنحاول اثارة العديد من التساؤلات عن تقييم الأمان الحيوى وتحرير تجارة السلع المهندسة وراثيا . بالنسبة للأمور الاجتماعية والاقتصادية المرتبطة بالسلع المحولة وراثيا يمكن للقارىء الرجوع الى إصدارات (Bouher ، ١٩٩٥ ، Krimsky and Wrubel ، ١٩٩٦) .

الجدل حول الأمان الحيوى : استعراض مختصر Biosafety debate

التكنولوجيا الحيوية من الاقترابات المتميزة بين التكنولوجيا التى تطورت فى مفهوم ومن منطلق أن النواحى ذات المردودات السلبية عرضه للنقد بين العامة والخاصة حتى من قبل وصول المنتجات للأسواق . الخبرات المكتسبة من التكنولوجيا في الماضي والتي قيل أنها آمنة فى وقت تسويقها ولكن أهميتها انحسرت بعد ذلك واتجهت الأنظار والامتنان فى نواحى التداخلات العريضة بين مختلف مكونات نظم الحياة على كوكب الأرض . لقد بدأت الاهتمامات الأولى بنواحى الأمان الحيوى من خيرة اللجان العلمية وقادة الهندسة الوراثية خلال السبعينيات (Grobstein ، ١٩٧٧ ، Krimsky ، ١٩٨٢) . لقد برز رأى بضرورة تجميد نشاط تجارب الهندسة الوراثية حتى تستكمل التشريعات الخاصة بالأمان الحيوى بما يغطى كل الانتقادات الموجهة . فى الأساس أدى هذا الأمر الى الامتنان بقوة طرق التعديل الوراثي الجديدة واتساع دائرة الحذر والحيطة وتصحيح المسارات .

مؤتمرات Asilomar وإعداد دلائل أمان الدنا المندمج (r-DNA) فى عام ١٩٧١ فى الولايات المتحدة الأمريكية مهد الطريق لوضع وتحوير دلائل مماثلة فى بلدان أخرى (Levin and Strauss ، ١٩٩١) . لقد ساعد ذلك فى تقدم تجارب الهندسة الوراثية للمستوى الذى وصل الى التطبيق العملى فى الحقبة التاريخية التالية . خلال هذه الفترة تم تبديد العديد من المخاوف وثبت أن الدلائل عقلانية وتؤكد على إطارات الأمان للبحث وتطوير التكنولوجيا الحيوية الجديدة اللازمة . الآن تم قبول مراتب Categories من الأمان فى المعامل (واحد الى أربعة مستويات) فاعلة وتعمل فى الدول المتقدمة والنامية. على نفس القدر واستتباعا لتطوير الميكروبات المتحولة وراثيا والنباتات المحورة جينيا تم وضع دلائل للإنتاج الصناعى الواسع بالإضافة الى التجارب الميدانية على المستوى الصغير فى السنوات الأخيرة (Doyle and Persley ، ١٩٩٦) . لقد أتاح ذلك الى تقييم

عقلانى عن مقدرة واقتدار المخاطر وقد توفرت أدلة محددة من التجريب أدت الى الحصول على استنتاجات موثوق فيها .

الفحص المتأنى لكل ما يثار حول الأمان الحيوى من آراء وانتقادات يشير الى حدوث تغير تدريجى فى موقف ونظرة الأطراف المشتركة فى الحوار . بناء على موقف العناد الابتدائى فى البداية فرض وتطلب النشاط الخاص بتجريب ونشر النباتات المهندسة وراثيا محل الشكوك وقد أدى ذلك الى قبول مفهوم ونظرة أن الهندسة الوراثية غير آمنة بشكل جوهرى (Rissler and Mellon ، ١٩٩٣ ، Hoyle ، ١٩٩٦) . هذا بسبب أن التجريب المستمر أدى الى تراكم بيانات علمية كبيرة أتاحت كم من المعلومات أدت الى التركيز على التقييم الواقعى لمنظومة الخطر فى مقابل الفائدة .

الهندسة الوراثية وتربية النباتات

أهداف تربية النباتات والهندسة الوراثية للنباتات تتداخل بشكل ملفت للنظر . بالرغم من وجود اختلافات هامة بين هذين النشاطين إلا أن التداخل أمر وارد . هذه الاختلافات ترتبط بالمدخلات التكنولوجية ومجموع الجين فى العينة ودقة التعديل والتحوير وموقع الجين فى النبات المستقبل (Boulter ، ١٩٩٥) . حيث أن هذه الاختلافات تساهم فى معظم نواحى الأمان فأنها سوف تناقش باستفاضة كل مها مستقل عن الآخر . فى التربية النباتية التقليدية فان الاستفادة من مجموع الجين يكون مفيداً على الاختلافات فيما بين الأنواع المتخصصة والتى تمتد عرضيا الى الأنواع الشديدة القرب منها . مع الطرق الحديثة من زراعة الخلية والبروتوبلاست يمكن التوسع أكثر الى الأنواع البرية القريبة أو الجنس (Waara and Glimelius ، ١٩٩٥) . على العكس فان التكنولوجيا r-DNA تدمر كل الحواجز وتسمح بتبادل الجين بين أى كائنين عبر نهايات شجرة النشوء . بالإضافة الى ذلك يكون فى الإمكان تصميم جينات جديدة de novo لإنتاج منتجات جديدة. الهندسة الوراثية تتطلب زيادة المهارات التقنية لأنها تتضمن دقة فى عزل الجين المطلوب ونقله وتعبيره فى المستقبل المستهدف . هذا الاقتراب يسمح كذلك بالسيطرة على التعبير الوفير والمؤقت للجين فى العائل الجديد (Keil وآخرون ، ١٩٨٩) .

المعلومات الدقيقة عن الجينات المتحركة / المنتجات الجينية تسمح باستكشاف الجينات التى تدخل وتقدم من خلال تكنولوجيا الدنا المندمجة r-DNA فى الأجيال المتتابعة. طرق التربية النباتية التقليدية ليست دقيقة بما فيه الكفاية بما يسمح بتعديل الجينات الفردية جنبا الى جنب مع الجين المرغوب كما أن الجينات القريبة الارتباط دون قصد تتحرك كذلك

للمستقبل وليس من السهولة التخلص من هذه الجينات غير المرغوبة . كذلك فانه وبعيداً عن التأثيرات الفينولوجية يوجد قليل من النواحى توجه استكشاف الجينات فى التربية التقليدية .

التكنولوجيا الجارية للهندسة الوراثية لا تسمح بتوجيه الجينات ناحية مواقع متخصصة على جينوم العائل حيث أن الجينات تتكامل عشوائيا على مواقع مختلفة على كروموسوم العائل . على العكس من ذلك فان تبادل الجينات يحدث من خلال متعضيات متماثلة / أزواج متعضيات متماثلة وتعبر لما بعد ذلك فى التربية التقليدية . فى هذه الحالة فان الوضع النسبى للجينات على الكروموسوم تبقى بدون تغيير خلال التبادل الجينى . التساؤل الآن كيف أن هذه الاختلافات بين التربية النباتية التقليدية واقتراب الدنا المندمج r-DNA يترجم الى نواحى الأمان الحيوى ؟ عندما تقدم الجينات من الكائنات غير المرتبطة تماما فى النباتات بواسطة الهندسة الوراثية فان إنتاج منتجات جديدة بصفات لم يكن متنبأ بها بسبب التداخل بين العائل والنواتج المتحولة وراثيا . إن الزرع أو الإدخال العشوائى للجين الناقل قد يؤدى الى تنشيط أو إخماد جينات العائل القريبة من نقطة الدخول مما يؤدى الى تكوين طرز وراثية غير متوقعة (Feldman وآخرون ، ١٩٨٩ ، Fujiwara and Beachy ، ١٩٩٣) . لقد لوحظت تباينات عريضة بين المتحولات الوراثية المستقلة لنفس الجين وهذا يرجع فى الغالب الى تأثيرات الموضع وسكون الجين وغيرها (De Block ، ١٩٩٣ ، Flavell ، ١٩٩٤) . إذا كان الجين المتحول يشفر منتج منظم (مثال عامل الاستنساخ) فان أنشطة جينات العائل الأخرى يمكن ان تتأثر وتنتج فيما يسمى التأثيرات pleiotropic . زرع جين غريب فى موضع عشوائى على الكروموسوم يمكن فى حالة الدمج مع جين العائل تخلق جين جديد قوى . مثل هذا الحدث يمكن أن يؤدى الى الحصول على منتج جين جديد تماما لم يكن تحت التنبؤ من المعلومات عن خصائص الجين المتحرك. بالرغم من أن هذه الأحداث قد لا تكون مسببة للأخطار فى العادة فان عدم التنبؤ بتتابعاتها يجعلها ذات أهمية خاصة فى الأمان .

التساؤل الآن يتمثل فيما إذا كانت الحوادث التى سجلت أشارت الى صحة هذه الاهتمامات والاتجاهات ؟ وإذا كانت مسجلة هل هذه الحوادث تتماثل مع طرق وخطوات الهندسة الوراثية وهل لا تحدث فى التربية التقليدية ؟ من الضرورى تناول هذه الأسئلة قبل الكلام عن النواحى الخاصة بالأمان الحيوى التى ترجع الى النباتات المهندسة وراثيا . لقد افترض أن تربية النبات آمنة بسبب أنها تتضمن العمل بمجموع الجين للأنواع القريبة الارتباط معها . بالرغم من أن النقد الموجه الى الأمان الحيوى للكائنات المهندسة وراثيا (Gmos) تعاظم إلا أنه خلق نقداً أكبر يتمثل فى تحدى كبير لتباين منظور هذا الاقتراب (Shibamoto and Bjeldames ، ١٩٩٣) . الأقارب البرية التى استخدمت فى التربية

التقليدية عرفت بأنها تحتوى على مواد سامة أو مثيرة للحساسية وهناك حالات تتمثل فى أنه عند إدخال المورثات الخاصة بالجينات من خلال التربية من الأنواع البرية تحدث أضرار أكيدة . مثال ذلك صنف البطاطس لنياب الذى تم تهجينه لتحقيق جودة فى تجهيزه كشرائح رقيقة (شيبسى) وجد أخيراً أنه يحتوى على كميات كبيرة من الجلايكوالكالويدز الضارة ومن ثم تم سحبه (Zitnak and Johnston ، ١٩٧٠) . على نفس المنوال فان صنف الكرفس الذى تم تربيته لتحقيق مقاومة عالية للحشرات سحب بسبب الزيادة ثمانية أضعاف فى Psoralen المسئول عن المقاومة للحشرات والذى تأكد أنه يسبب هرش وحروق فى الآدميين (Ames وآخرون ، ١٩٩٠) . لذلك فان استخدام الجيرمبلازم البرى فى التربية التقليدية لإدخال جينات المقاومة حيث المدخل الفسيولوجى وتقنية الفعل غير معروفة يمكن أن تكون أكثر خطورة عما هو الحال مع الجين المتحرك الموصف جيداً خلال الهندسة الوراثية (Franck – Oberaspach and Keller ، ١٩٩٧) .

الاقتراب الخاص بسكونية جينات العائل بواسطة إدخال الجينات الناقلة ليست متماثلة مع الهندسة الوراثية . سكون وعدم حركية الجين بسبب نشاط transposons مسجلة جيدا فى المراجع (Berg and Howe ، ١٩٨٩) . كذلك فان سكون الجين المتجانس بسبب تضاعف الجين سجل فى النباتات (Todd and Vodkin ، ١٩٩٦) . ظاهرة مثل سكون الجين تحدث فى الطبيعة أو تنتج من نشاط تربية النباتات لم ينظر إليها على أنها فاجعة Catastrophic لذلك لا توجد أدلة لمعاملة سكون جين العائل بسبب إدخال الجين الناقل ليكون كما فى خطر الأمان الكبير " major safety risk " .

لقد وجهت نفس الانتقادات لنقل الجينات غير المتجانسة بواسطة طرق الهندسة الوراثية . التعديلات الجينية التقليدية تؤدى الى حدوث انتقال أو حذف أو تحول ... الخ وكذلك الخلل فى الترتيب الجينى العادى وأحيانا يسبب تبادل غير متجانس للمادة الوراثية . عندما لا يؤخذ فى الاعتبار مخاطر الأمان الحيوى لا يوجد سبب لرؤية الأضرار غير العادية فى مضمون الهندسة الوراثية . البيانات الرياضية وتمثيل الأساسيات العامة الخارجة من النشاط العلمى فى مجالات مثل الوراثية والميكروبيولوجي وبيولوجيا النشوء سوف يؤدى بنا الى الاعتقاد أن المنتج ليس له مخاطر لأنه نتج من خلال تكنولوجيا الدنا المندمج r—DNA . بدلاً من ذلك فان تقييم المخاطر سوف يركز على المركب أكثر من التركيز على العملية أو الطريقة التى استخدمت للحصول عليه . التقييم بناء على هذا المعيار يبدو أنه لا يوجد أدلة وبراهين لاعتبار التحويرات لصفات خاصة الناتجة من الهندسة الوراثية على أنها أكثر ضرراً أو خطورة عن المنتجات من التربية التقليدية عندما تشتق الأقارب البرية أو الجينات منها وتؤخذ فى الحسبان .

التشريعات الخاصة بالأمان الحيوى Biosafety regulations

الإصدار والاهتمام الخاصة يجب أن يوجه ناحية كل مراحـــل التطـــور وتحريـــر Gmos ومنتجاتها المشتقة بداية بالبحوث المعملية للمكافحة فى الصوب الزجاجيـــة لكـــى يجعل من التجارب الحقلية محدودة بما يسمح بانتشارها فى البيئة ومواجهة وتحجيم النشـــر الحر دون تنظيمات تشريعية . يمكن تحقيق الأمان بواسطة تحليل المخاطر المشتركة فـــى العملية والنصح بالإدارة المناسبة لتقليص دور التأثيرات السالبة الممكنة . حيـث أن Gmos تستطيع أن تتحرك خارج نطاق الحواجز السياسية فى القارات الجغرافية كما أن التشريعات الخاصة بالأمان تحتاج لتحقيق أساسيات القبول الدولى . الى جانب تجنب التضـــارب فـــى التجارة الدولية للمنتجات الخاصة بالـــ Gmos (Hoyle ، ١٩٩٦) مع ضرورة العمـــل بالتشريعات الدولية فى هذا الخصوص .

لقد كان المعهد القومى للصحة من خلال لجنة دمج الدنا (NIH – RAC) من أوائل الهيئات التى وضعت وأصدرت الدلائل عن الأمان الحيوى فـــى تجـــارب r-DNA عـــام ١٩٧٦ . لقد تم تحوير هذه الدلائل بعد ذلك واستخدمت فى العديد من الدول فى كل أنحـــاء العالم . فى السنوات الحديثة أخذت هيئات كثيرة الريادة فى وضع الوثائق الخاصة بالأمـــان الحيوى الخاص باقتراب Gmos مثل منظمة التعـــاون والتطـــور الاقتصـــادى (OECD) ومنظم التقدم الدولية التابعة للأمم المتحدة (UNIDO) ومنظمة الغذاء والزراعة (FAO) .

اقترابات مشكلة الضرر الحيوى Biohazard problem

بوجه عام فانه يمكن تحقيق الأمان الحيوى خلال تحليل وإدارة المخـــاطر . تحليـــل المخاطر يتضمن تعريف : المخاطر والأضرار والعوامل التى قد تؤثر على حدوث الضرر وتتابع حدوث الضرر المتنبأ به . إدارة الخطر من جهة أخرى يجـــب ان يشـــمل : اتخـــاذ خطوات لتقليل احتمالات حدوث الضرر وكذلك احتواء او معادلة التأثير الذى قـــد يحـــدث ضرر فعلى وحقيقى . واحد من الاهتمامات الكبرى مع GMOS يتمثل فى أنه عند نشـــره فى البيئة فانه لا يمكن الاستكشاف الشامل لانتشارها ولا استرجاعها إذا وجدت ضارة أخيراً . لقد تم تطوير مدى شامل من النباتات المهندسة وراثيا والنواتج النباتية باســـتخدام المـــادة الوراثية من الفيروسات للحيوانات الراقية . التساؤل يتمثل فى أنه كيف لأحـــد أن يتوجـــه ناحية تحليل الأمان الحيوى لكل هذه المنتجات ؟ كما قيل فى السابق فان إصدارات الأمـــان الحيوى للـــ Gmos يجب أن توجه الى المنتج وليس العملية التى يتم من خلالـــها تطويـــر المركب . الإطار الذى تم تطويره بواسطة المركز القومى للبحوث التابع للأكاديمية القوميـــة للعلوم فى أمريكا وضع العوامل الأتية ذات الأهمية فى تقييم المخاطر :

- توصيف الكائن الحى الذى يساهم بالجين .
- الجين أو التتابع الذى يتميز بالحركة .
- مستقبل المادة الوراثية .
- الصفات التى تتحقق بواسطة الجين فى العائل الجديد .
- البيئة التى يتم فيها تقديم GMO .
- التداخل بين الكائن الحى والبيئة .
- الاستخدام الذى يوجه إليه المنتج .

المعلومات عن هذه العوامل محددة فى اتجاه تقييم المخاطر . إذا كان المانح للمادة غير مرضى ذات خلفية بأمان الاستخدام فى التربية النباتية التقليدية فانه يعتبر غير ضار . بالنسبة للمانح المعروف عنه أو الذى ثبتت مرضيته أو إذا كان هناك نقص فى المعلوماتية الخاصة به فانه يستوجب اتخاذ الحيطة . على نفس المنوال فانه إذا كان الجين موصف جيداً وتم تحويره بشكل مناسب للتعبير بنظام معروف ومحدد فى العائل الجديد فان مرتبة المخاطر الخاصة به ستكون قليلة . بناء على عائلية المانح GMos . الخطر الداخلى لكل من هذه العوامل التى ذكرت قبلا يمكن أن تقسم الى مراتب لتحديد المستوى الشامل لعامل الأمان . هذه المخاطر تعتمد على الجبرية فى التشريعات قد اقترحت لإجراء التجارب الحقلية فى البلدان المختلفة (Miller وآخرون ، ١٩٩٥) .

بعد وضع هيكل ونظام الخطر فان خفض المخاطر يمكن اعتباره لتلك الأخطار التى تزيد عن مستوى المقاومة المقدرة . حيث أن قيمة المخاطر تتمثل فى ناتج احتمالات حدوث الضرر وشدة الضرر فان الخطر يمكن خفضه بتقليل واحد أو كلا العوامل المذكورة سابقاً . نماذج تخليل الضرر هذه متوفرة وقد اقترح استخدامها لتقرير الأمان الحيوى GMos . تقييم المخاطر هذه يصبح محدداً لتقدير ماذا نشرع ولأى حد نشرع (درجة التشريع) . يقوم هذا التقييم كذلك بتعريف الفجوات فى معلوماتنا ويساعد فى توجيه نوع التجارب الواجب إجراءها ونوع النباتات الواجب جمعها والحصول عليها من أجل الاستخدامات المستقبلية .

حيث أنه لا يوجد نشاط إنساني بدون إشراك التتابعات كما لا يمكن ضمان أمان أي تكنولوجيا والقول بانها خالية من أى مخاطر يصبح من الأهمية تحقيق التوازن بين درجة فوائد الأفعال الموجبة والتتابعات الممكنة لعدم استخدام التكنولوجيا لاشتقاق أساسيات الدلائل.

لقد أجريت العديد من التجارب الحقلية على المستوى الصغير والقليل منه على مستوى واسع تجاري النطاق لزراعة النباتات المهندسة وراثيا خلال السنوات القليلة الماضية فى الدول المتقدمة مثل أمريكا واليابان والصين وأستراليا وإنجلترا وألمانيا لتحديد نواحى الأمان الرئيسية للـ Gmos فى البيئة تشمل :

- المحصول المهندس وراثيا قد يصبح حشيشة .
- الجين المنقول قد يهرب الى الأنواع القريبة المرتبطة والأقارب الحشائشية / البرية قد تؤدى الى ظهور وتطوير الحشائش السوبر Super weeds .
- حركة الجين المنقول الى الأنواع البرية قد يغير من لياقته ويشتت التنوع الوراثى .
- الجينات المنقولة المقاومة للآفات ومسببات الأمراض قد تؤدى الى نشوء سلالات / طرز وراثية جديدة أكثر عنفوانية .
- منتجات الجين الجديد قد تغير البيئة من منطلق تأثيراتها على الكائنات غير المستهدفة .
- منتجات التحول الجينى قد يكون لها أضرار حيوية للإنسان وغيرها من الحيوانات والكائنات الحية .
- المنتجات الوسيطة أو المتحولة وراثيا أو نواتج انهيارها قد يكون لها أضرار صحية .

التتابعات الايكولوجية كنشر النباتات المهندسة وراثيا فى البيئة نوقشت قبلا . الأمان الحيوى للمنتجات الغذائية للإنسان والحيوان يمكن أن تقيم أساساً على أساس التغيرات الخاصة المدخلة . من السهولة النسبية تأكيد الأمان للمنتج عندما تستخلص وتنقى قبل تقديمها للمستهلكين (مثال ذلك السكر والزيوت) . بالرغم من أن النباتات المهندسة وراثيا ينتج مركبات جديدة إلا أن الأمان لابد أن يقيم تحت مختلف ظروف النمو والاستخدام . الحيوانات والبشر قد يتعرضون للنباتات المهندسة وراثيا و/أو منتجاتها بطرق مختلفة منها: التعرض المباشر خلال زراعة المحصول ، خلال استنشاق حبوب اللقاح ، استهلاك المنتج أو دخوله غير المباشر فى السلسلة الغذائية . الأغذية المحورة وراثيا قد تستهلك على صورتها الخام أو بعد الطهى والتجهيز بطرق مختلفة . لذلك فان تقييم الأمان الحيوى للغذاء يجب أن يعتبر على مستويات مختلفة . بالنسبة للأمان الصحى للغذاء فان استخدام مفهوم "المكافىء الجوهرى" Substantial equivalence للطعام المهندس وراثيا الى الصورة

الأصلية غير المتغيرة تم وضعها (OECD ، ١٩٩٣ ب) . الآن أصبح إنتاج النباتات المتحورة وراثيا ذات نشاط كبير كالفوران والجينات الناقلة استخدمت بالرغم من افتقار المعلومات المتاحة للدقة . الهيكل التمثيلي للنباتات المهندسة وراثيا يصعب معرفته . بالرغم من أنه يسهل التمييز بين فردين مما يؤكد تكافؤ جوهرى يتطلب التفاصيل (غالبا غير منتهى) من خلال التحليل والمقارنات . إن التأكد من الأمان الحيوى للنباتات المهندسة وراثيا يعتبر من المهام الضرورية الواجبة . بالرغم من الأساسيات العامة عرفت مبكرا فان النباتات المهندسة وراثيا تم تقييمها على أساس حالة بحالة فيما يتعلق بتأثيرها على البيئة والحيوانات والإنسان .

فى السنوات القادمة عندما يتحقق الأمان الحيوى للنباتات المهندسة وراثيا سوف يزداد أعداد هذه النباتات الى النظام الزراعى . لذلك يجب النظر الى الأمان الحيوى من منظور أوسع .

نشر النباتات أو الجينات الناقلة فى مراكز التنوع المحصولى

فى مراكز التنوع المحصولى فان الأصناف النباتية تنمو فى منطقة الصور البرية والحشائشية . إنسياب الجين بين المحاصيل والحشائش فى هذه الأماكن تم تسجيله (Dale ، ١٩٩٤ ، Jorgensen and Andersen ، ١٩٩٤) . لذلك فان انفراد النباتات المهندسة وراثيا فى مراكز التنوع الوراثى سوف تؤدى بالتأكيد الى هجرة الجين الناقل فى مصادر الجيرمبلازم البرى . بالرغم من أخذ حركة مخاطر الجين الناقل فى الاعتبار يصبح من الأهمية فحص الحقيقة . مراكز تنوع المحاصيل Vavilovian توجد فى مناطق التحسين الاقتصادى من العالم . تنوع الجيرمبلازم فى هذه المناطق يعضد بقوة بسبب تحطيم المسكن (إزالة الغابات ، إقامة السدود ... وغيرها) وتنوع الأرض للزراعة والتمدين ... الخ . لذلك فان إدخال الأصناف النباتية المهندسة وراثيا والتى تعضد الزراعة المتواصلة لن تزيد من قوة الأقارب البرية بشكل معنوى .

بالإضافة الى ذلك فانه خلال الهندسة الوراثية يحدث تغيير فى العديد من الصفات النباتية مثل المقاومة للاجهادات الحيوية وغير الحيوية وهذه لا تمثل تحديات لاستمرار بقاء ومعيشة الأقارب البرية تحت الظروف الطبيعية . إذا لم تحقق الجينات المنقولة أى ميزة للأقارب البرية لا يستحب إدخالها فيها . على العكس من ذلك فان الجينات المنقولة قد تنشط ما نحتاج اليه من زيادة الإنتاجية المحصولية ومن ثم نعود الى تعضيد الاستفادة من تنوع الجيرمبلازم المستوطن . فى الدول المتقدمة فان الموقف يكون مختلفا . هذه الدول لا تجابه الضغوط لإنتاج غذاء أكثر وحتى الحاجة للاستعانة بالأقارب البرية القليلة أقل فى

القيمة من الدول النامية . لذلك فان النسبة بين الفائدة والخطر بسبب الجينات الناقلة صغيرة . من هذا المنطلق فان الدول مثل أمريكا وأستراليا لم تنشر الجينات الناقلة فى المناطق التى توجد فيها الأقارب البرية . إن الضغط والإلحاح الواقع على عاتق الدول النامية يحتاج الى تقييم أكثر عقلانية وشدة للمخاطر . إن الإدارة والسيطرة على المخاطر risk management يجب أن تؤخذ بشكل مناسب حيث أن النباتات المتحولة وراثيا ذات المميزات الكبرى يجب أن تؤخذ فى الاعتبار من النواحى التجارية حتى فى مراكز التنوع المحصولى .

التأثيرات على المدى الطويل للنباتات المحولة وراثيا

تقييم الأمان الحيوى تبنى بوجه عام على التجارب صغيرة المستوى . استقراء نتائج هذه التجارب لتقييم المخاطر على المدى الطويل من الأمور الصعبة . حيث أن الخطر يمثل أساس مبنى على وظيفة فان الزراعة على المستوى الكبير سنة بعد أخرى سوف يزيد بشكل طردى من فرصة التأكد من حقيقة الضرر . بعض من هذه التأثيرات غير المرغوبة للنباتات أو الجينات المحورة المنقولة قد تظهر فقط بعد تعرض طويل . الحساسية للغذاء بين مجاميع البشر ترتبط بالتناول طويل المدى للغذاء غير الآمن . أظهرت الخبرات من نشوء المحاصيل أن الحوادث ذات الفرص الكبيرة وحتى لو كانت نادرة يمكن أن تقع وتؤدى الى حدوث تغيرات كبرى . مثال ذلك العديد من الأنواع النباتية عديدة الصبغات تحدث فى الطبيعة ضد الاحتمالات عالية السلبية (Douney وآخرون ، ١٩٨١) . بالرغم من أن كمية صغيرة جدا من المادة المثيرة للحساسية تكون كافية لإحداث التفاعل فان زيادة الجرعة كما هو معروف تزيد من شدة الأعراض . على نفس المنوال فان سمية الغذاء ترتبط مباشرة بطول ومستوى التعرض . فى حالة التسمم بالجلبان Lathyrism فان ظروف الوهن والضعف التى تحدث بين مجاميع القبائل فى بيهار (الهند) والتى تنشأ من الاستهلاك الطويل للجلبان تأكدت من تقييم الأمان للتأثيرات طويلة المدى للنباتات المهندسة وراثيا .

بالرغم من أن مصدر الجين قد يساعد فى تحديد مقدرته فى إحداث الحساسية فان تقييم السمية يتطلب معلومات حول مستويات تركيز المنتجات المتحولة فى النباتات (أو أجزاء النبات) وكذلك الكمية التى تستهلك منه . لذلك فانه حتى ولو كان الجين مشتق من المحصول النباتى فان الأمان على الحيوانات والإنسان يحتاج الى التقييم . التأثيرات الصغرى للجينات المنقولة على أحياء التربة الدقيقة قد لا يكون ظاهراً فى التجارب صغيرة المستوى . يجب التذكرة بأنه لا يوجد سبيل للكشف عن هذه التأثيرات الصغرى من خلال التجارب على المستوى القريب . الزراعة المبنية على الفهم الجيد والعقلانى مع الاستكشاف

المناسب هو السبيل الوحيد لتبديد هذه المخاوف . إن حجب أى منتج بسبب المخاطر والأضرار التى لم تختبر فى مقابل العديد من الفوائد أمر غير مقبول من العامة والخاصة .

حقيقة وأهمية الاختبارات البيئية المقدرة

تأثير البيئة على التعبير الجينى يمثل كما أتفق عامل وجزئية هامة فى تشكيل الطرز الوراثية الحقلية . إختبارات الأمان الحيوى فى بيئات متعددة مكلف للغاية ويزيد من الوقت ما بين الحصول على المنتج من خلال التكنولوجيا الجديدة واستغلالها الاقتصادى . الاستثمار فى البحوث لإنتاج النباتات المتحولة وراثيا عالى جدا ولذلك فان الدخول فى مغامرة الاتجار فى هذه النباتات المحورة يركز على المنتجات عالية القيمة أو على المحاصيل واسعة الانتشار . السؤال الذى يطرح نفسه طبيعيا يتمثل فى أنه هل يجب أن تتعرض النباتات المتحولة وراثيا لاختبارات على المدى الطويل فى كل المواقع الممكنة والمحتملة قبل أن يعلن عنها أنها آمنة للنشر والتسويق التجاري .

للإجابة الدقيقة عن هذا التساؤل تجدر الإشارة الى أن البيئة ذات مكونات عديدة . المكونات التى يلائمها اختبارات الأمان الحيوى للنباتات أو الجينات المحولة وراثيا تشمل الناس والعمليات الزراعية والأمراض والآفات والاجهادات غير الحيوية والأنواع البرية ومواد نشر حبوب اللقاح ومستويات التلوث . الجين المسئول عن إحداث الحساسية لحبوب اللقاح Bet v1 لنبات تبيولا فيراكوزا يعبر عنه بشكل كبير تحت ظروف التلوث وليس تحت ظروف عدم التلوث (Scheiner، ١٩٩٢) . الزيادة الحالية فى الحساسية عن طريق الاستنشاق فى المناطق الصناعية قد ترجع الى التعبير المغاير للمواد المثيرة للحساسية فى حبوب اللقاح (Profet ، ١٩٩١) . من المعروف أن التركيب الآفة / الممرض يتباين بشكل عالي بين المواقع المختلفة والتعبير عن جينات العائل المتخصصة (مثال ذلك جينات البروتين PR) تتباين فى علاقتها بالمنشطات الموقعية . لذلك فان اختبار الجينات المحولة فى مكان جديد يكون ضروريا لمعرفة التداخلات غير المتنبأ بها بين العائل ونواتج التحول الوراثى . إن اختبار الجين المحول للنشر فى مكان جديد عندما يكون قد أختبر وثبتت أمان فى مكان واحد يكون ضروريا فقط فى المواقف التى تكون فيها مكونات البيئة مختلفة بما فيه الكفاية وقابلة لأية اختبارات إضافية . عندما تكون البيئات المجاورة متشابهة لا يكون هناك أرضية لإجراء اختبارات جديدة .

تتابعات الانتشار الواسع لزراعة الأصناف المحورة وراثيا

بمجرد الموافقة على النباتات المهندسة وراثيا للنشر والتسويق التجارى يتوقع أن العديد من الوكالات سوف تحصل على أصناف أخرى باستخدام نفس الجينات أو الجينات

المشابهة . مثال ذلك أن العديد من المعامل تعمل بجينات البكتريا باسيلليس Bt لتحقيق المقاومة للآفات الحشرية (Krimsky and Wrubel ، ١٩٩٦) . ان تجميع الجينات المختلفة ولكنها مرتبطة موصى بها لتجنب أو تأخير تطور المقاومة ضد النباتج المحول وراثيا بواسطة الآفة (Tabashnik ، ١٩٩٤) . النظام الحالى لاختبارات الحالة بالحالة Case-by-case لا تأخذ فى الاعتبار تتابعات زراعة المتزامنة للأصناف النباتية العديدة المهندسة وراثيا باستخدام نفس الجينات المحولة (Bhat and Chopra ، ١٩٩٨) .

فى الحالات التى تكون فيها المحاصيل المختلفة محتوية على نفس الجينات المنقولة لإحداث المقاومة لمبيد الحشائش فان زراعة نفس التقاوى الذاتية سوف يؤدى الى الحصول على حصاد ذات تقاوى مخلوطة حتى لو أخذ في الاعتبار الزراعة الذاتية أى تقاوى نفس المحصول الناتج كحشائش . النسخ المتعدد لنفس الجينات أو الجينات المرتبطة المتجانسة معروف أنها تسبب سكون الجينات المحولة (Flavell ، ١٩٩٤) . عندما تحمل العديد من الأصناف نفس الجينات المحولة أو مثيلاتها وتزرع فى منطقة قريبة فان سكون الجينات قد يحدث فى الأجيال المتعاقبة بعد تبادل الجين بين الأصناف . مثل هذا الانسياب للجين شائع بين الأصناف النباتية (Ibarra and Perez وآخرون ، ١٩٩٧) . عند حدوث السكون يحدث فقد كبير فى المحصول لأن الجين أوالجينات المحولة تصبح غير فعالة ومن ثم يزيد الفقد من الآفات والأمراض وعقم حبوب اللقاح والتقاوى .

يجب ان يظل فى الحسبان أنه عندما يقترن نفس الجين فى المحاصيل المختلفة لتحقيق المقاومة (مثل Bt) فان نشوء المقاومة بين الآفات الآكلة المتعددة العوائل سوف يحدث لها إسراع . استخدام جين البروتين المغلف للفيروس لتحقيق المقاومة للفيروس دخلت النطاق التجارى (Hull ١٩٩١) . من الناحية النظرية يوجه النقد تجاه أن جيل جسيمات الفيروس مع خلائط جديدة للدنا الخاص بالفيروس الغريب والبروتين المغلف للجين المحول (الكبسلة الانتقالية) ذات إمكانية واضحة للحدوث (Osbourn وآخرون ، ١٩٩٠) . هذه الكبسلة سجلت فى الطبيعة عندما تحدث عدوى للعائل باثنين أو أكثر من الفيروسات (Wen and Lister ، ١٩٩١) . حيث أن نقل بعض الفيروسات خلال الناقلات يحدث من خلال البروتين المغلف فان الكبسلة سوف تمكن من دخول الفيروسات الغريبة فى عوائل جديدة (Bourdin and Lecog ، ١٩٩١) . فى العادة تكون هذه الحركة ذات تتابعات قليلة لأن الفيروس لن يكون فى إمكانية الانتشار الى نباتات أخرى لأن البروتين المغلف المطلوب لنقله بواسطة (القديم) الناقل القديم لم يخلق فى العائل الجديد (Koenig and Lesemann ، ١٩٩٤) . عندما يكون العائل شجرة معمرة أو نبات

يتضاعف خضريا فان حركة الفيروس خلال الكبسلة تساعد بواسطة الجينات المحولة ومن ثم تصبح مشكلة خطيرة . كذلك إذا كان العائل الجديد فى المقابل محول جينيا بحيث ينتج البروتين المغلف فان دورة ثانية من الكبسلة يمكن أن تزيد من حركة جسيمات الفيروس .

فى المستقبل فان نشر الجينات المحولة أو النباتات المهندسة وراثيا يجب ان تأخذ فى الاعتبار المخاطر والنواحى غير المحدودة ليس للأفراد أو الحالات الفردية فقط ولكن لمواقف جماعية من النظام المحصولى فى المنطقة . هذا السيناريو يتمشى مع ما هو موجود فى الدول المتقدمة حيث تزرع النباتات المهندسة جينيا على شكل واسع . فى الدول النامية حيث معظم الأراض ذات ملكيات صغيرة وواقع بطيء إدخال الزراعة الحديثة والأصناف النباتية عالية الإنتاج فان هذه المخاوف ليست مسببة للقلق فى الوقت الراهن .

تنظيم وتشريع الاستكشاف على المدى الطويل

حيث أن التشريعات المناسبة والتعضيد الفعال تمثل مفتاح السيطرة الناجحة وإدارة المخاطر فان عقلانية استكشاف الجينات المحولة وراثيا تحت ظروف الزراعة التجارية فى غاية التعقيد . عندما تم هندسة نفس المحصول باستقلالية لأغراض مختلفة وزراعة الأصناف الناتجة بشكل وعلى نطاق واسع يمكن تكوين خلائط مختلفة من الجينات والنباتات المهندسة جينيا بسبب سهولة إنسياب الجين . إن مخاطر الأمان على الإنسان والحيوان فى هذه الحالات تفترض وجود أبعاد جديدة . مثال ذلك أنه إذا زرع الجين المحمول وهندس فى صنف الأرز لخفض المكون المثير للحساسية وتقليله أو تكسيره بسبب السكون فانه يمكن أن يحدث مخاطر صحية للأفراد ذوى الحساسية للمركب المثار (Tada وآخرون ، ١٩٩٤) من غير الواضح من سيقوم باستكشاف هذه الأحداث بعد إقرار ومرور الجينات المحولة من منظور ومتطلبات الأمان الحيوى . بالإضافة الى ذلك من سيتحمل تكاليف الاستكشاف وميزانيات تمويل الحصول على موافقات وضمان عدم حدوث أية أضرار من هذه النباتات المتحولة وراثيا فى المستقبل ؟ كذلك من غير الواضح ماذا تحتاج لإجراء الاستكشاف على المدى الطويل وما هو المطلوب استكشافه ؟ من أحد السبل لتقليل معظم الأخطار هو الإصرار على أن الجينات التى تستخدم فى إنتاج النباتات المحولة وراثيا يجب أن تكون تحت السيطرة (مؤقتا وكذلك من ناحية التخصص الخلوى) للتعبير بواسطة محفزات خاصة يمكن استكشافها (Ward وآخرون ، ١٩٩٣) . كلما زادت المعلومات المكتسبة من التجارب والخبرات المستفادة سوف تتضح الصورة عن الأخطار والتشريعات الضرورية الواجب اصدارها وتشديد العمل بها . فى الولايات المتحدة الأمريكية وهى أكبر دولة فى العالم تكونت لديها خبرات واسعة فى هذا المجال وحظيت بتشريعات قوية لسنوات طويلة تحولت من السيطرة الى الارتخاء . لقد وضعت قوائم بمتطلبات الحصول على موافقات

الأمان الحيوى لمخرجات التكنولوجيا الحيوية التى يقال أنها نظيفة . للحديث بقية عن الوضع فى الدول النامية وخاصة وضع الأمان الحيوى فى مصرنا الغالية .

دراسة خاصة عن استخدامات الهندسة الوراثية فى مجال الزراعة

فى تقرير عرض فى اجتماع مجلس إدارة البحوث الزراعية فى شهر يونيو ٢٠٠٠ بناء على تعليمات السيد الأستاذ الدكتور / يوسف والى نائب رئيس الوزراء ووزير الزراعة واستصلاح الأراضى بشأن الدراسة الخاصة باستخدام الهندسة الوراثية فى مجال الزراعة من إعداد أ٠د٠ مجدى مدكور مدير معهد بحوث الهندسة الزراعية وجدت الكثير من المعلومات والجداول الجيدة مما دفعنى الى أن أتناولها فى هذا المقام حتى يقف القارىء على وضع التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية فى مجال الزراعة والأمان الحيوى . (جداول من ١٠-١ / ١٠-١٥) .

تم إعداد الدراسة الخاصة باستخدام الهندسة الوراثية فى مجال الزراعة بالاستعانة بالنشرة المعنونة :

(ISAAA Briefs Global Review of Commercialized Transgenic Crops : 1998) .

والواردة من المركز الدولى للبحوث الزراعية فى المناطق الجافة . يتناول هذا التقرير المفصل مدى تطبيق المحاصيل المهندسة وراثيا على المستوى العالمى فى عام ١٩٩٨ – باستثناء دولة الصين – حيث تم تطوير قاعدة بيانات عالمية للمحاصيل المهندسة وراثيا وتم مقارنة البيانات على أساس الدولة ، المحصول ، والصفات التى أدخلت الى المحصول بطرق الهندسة الوراثية . كذلك تم تقدير الفائدة الاقتصادية للمزراعين لبعض المحاصيل المهندسة وراثيا المختارة والتى تم زراعتها ما بين عامى ١٩٩٦ و ١٩٩٧ فى كل من الولايات المتحدة الأمريكية وكندا .

أن البيانات الحالية عن وضع المحاصيل المهندسة وراثيا المستخدمة على النطاق التجارى قد تم استكمالها بمناقشة العديد من المفاهيم الأساسية من بينها الأمن الغذائى العالمى والفوائد المحتملة بالنسبة لدول العالم النامية فى سوق عالمى سريع التطور .

أسهمت ٨ دول (٥ صناعية و ٣ دول نامية) فى تضاعف المساحة العالمية المنزرعة بمحاصيل محورة وراثيا أكثر من ١٥ مرة ويعد معدل اقرار المحاصيل المهندسة الوراثية من أعلى المعدلات بالنسبة للتكنولوجيات الحديثة وذلك طبقا للمقاييس الزراعية الصناعية . ويعكس ذلك الرضا المتزايد عن هذه المنتجات والتى تعطى الكثير من الفوائد

من بينها إدارة المحاصيل بشكل أكثر مرونة وزيادة الإنتاجية والحصول على بيئة أكثر أمنا عن طريق تقليل استخدام المبيدات القياسية وكل هذه الفوائد مجتمعة تساعدنا فى الحصول على زراعة أكثر استدامة .

فقد بلغت المساحة المنزرعة عالميا بالمحاصيل المهندسة وراثيا ١١ مليون هكتار عام ١٩٩٧ لتصل الى ٢٧,٨ مليون هكتار عام ١٩٩٨ بزيادة تبلغ ١٦,٨ مليون هكتار. فى عام ١٩٩٨ تم زراعة ٥ محاصيل أساسية مهندسة وراثيا فى ٨ دول كان من بينها ثلاثة دول هم أسبانيا ، فرنسا ، وجنوب إفريقيا والتى قامت بزراعة محاصيل مهندسة وراثيا للمرة الأولى .

كما تجدر الإشارة الى أنه لم يتم إضافة البيانات الخاصة بدولة الصين لقاعدة البيانات العالمية لأنها كانت مجرد تقديرات غير دقيقة والتى أشارت الى أن الصين قامت بزراعة مساحة تقل عن ١٠٠٠٠٠ هكتار من المحاصيل المهندسة وراثيا عام ١٩٩٨ والتى تمثل مساحة أقل من ١% من إجمالى المساحة المنزرعة بالمحاصيل المهندسة وراثيا . ويعد محصول الـ Bt Cotton هو المحصول الرئيسى المنزرع .

وبالاستعانة بالجداول المرفقة يتضح الآتى :

- المساحة المنزرعة بمحاصيل محورة وراثيا سنة ١٩٩٦ بلغت ١,٧ مليون هكتار وارتفعت عام ١٩٩٧ الى ١١,٠ مليون هكتار لتصل عام ١٩٩٨ الى ٢٧,٨ مليون هكتار . ويعتبر المعدل بالنسبة للنباتات المهندسة وراثيا فى الدول الصناعية الكبرى بين عامى ١٩٩٧ و ١٩٩٨ معدلا كبيرا حيث بلغ مقدار الزيادة ٩,٣ مليون هكتار الى ٢٣,٤ مليون هكتار عام ١٩٩٨ بمعدل زيادة ٢٥٠% .

- أما بالنسبة للمحاصيل المهندسة وراثيا وتوزيعها على مستوى العالم فنجد الولايات المتحدة تأتى فى المقدمة يليها الأرجنتين ثم كندا بينما نجد جنوب إفريقيا كدولة إفريقية نامية تزرع هذه المحاصيل بنسبة أقل .

- ومن أكثر المحاصيل المنزرعة المهندسة وراثيا هو فول الصويا حيث وصلت المساحة المنزرعة منه عام ١٩٩٧ الى ٥,١ مليون هكتار لتصل عام ١٩٩٨ الى ١٤,٥ مليون هكتار بمعدل زيادة ٢٩٠% يليه فى الترتيب الذرة ، القطن ، الكانولا ثم البطاطس . وقد لوحظ زيادة النباتات المهندسة وراثيا لمقاومة الاجهاد والأمراض حيث أنه زادت نسبة استخدام الجينات الخاصة بمقاومة الحشائش عام ١٩٩٧ من ٦,٩ مليون هكتار الى ١٩,٨ مليون هكتار عام

١٩٩٨ . أما بالنسبة للمحاصيل المقاومة للآفات فقد زادت فى عام ١٩٩٧ من ٤,٠ مليون هكتار لتصل عام ١٩٩٨ الى ٧,٧ مليون هكتار .

- ونجد سبعة دول قدمت أو أنتجت ١١ محصولا معدلا وراثيا على رأسها الصين التى زرعت قطن مقاوم للحشرات على مساحة ٦٣٠٠٠ هكتار تليها أسبانيا فى زراعة الذرة ومقاومة الآفات على مساحة ٢٠٠٠٠ هكتار ثم الأرجنتين ، جنوب إفريقيا ، الولايات المتحدة ، فرنسا ، المكسيك .

- ونجد محاصيل محورة وراثيا سائدة مثل فول الصويا المقاوم للحشائش حيث كانت المساحة المنزرعة منه ١٤,٥ مليون هكتار بنسبة ٥٢% يليه الذرة المقاومة للآفات (Bt corn) ثم القطن عالى المقاومة فالكانولا ثم الذرة المقاومة للحشائش .

- وقد لوحظ أن نسبة الوفر الاقتصادى المتوقعة للمحاصيل المهندسة وراثيا عالية جدا حيث بلغت تقريبا فى إحدى الحالات ١٠٩ مليون دولار فى فول الصويا المقاوم للآفات فى الولايات المتحدة .

- والفجوة كبيرة بين الدول النامية والدول الصناعية . وقد حدثت طفرة كبيرة فى الشركات المنتجة والمستخدمة للهندسة الوراثية وتشهد عمليات الدمج بين الشركات الكبرى على مدى أهمية هذه الشركات من الناحية الاقتصادية ومن الأمثلة الواضحة على عمليات الدمج ما حدث بين كل من Ciba / Sandoz حيث بلغ مقدار الدمج ٥ بليون دولار .

جدول (١٠-١) : المساحات العالمية لمحاصيل النباتات المهندسة وراثيا فى أعوام ١٩٩٦ ، ١٩٩٧ ، ١٩٩٨

السنة	المساحة هكتار (مليون)	المساحة بالآكر (مليون)
١٩٩٦	١,٧	٤,٣
١٩٩٧	١١,٠	٢٧,٥
١٩٩٨	٢٧,٨	٦٩,٥

* فيما عدا الصين

جدول (١٠-٢) : المساحات العالمية للمحاصيل المهندسة وراثيا في أعوام ١٩٩٧ ، ١٩٩٨ : البلدان الصناعية والنامية (بالمليون هكتار) .

	١٩٩٧	%	١٩٩٨	%	الزيادة (نسبة)
الدول الصناعية	٩,٣	٨٦	٢٣,٤	٨٤	١٣,٩ (٢,٥)
الدول النامية	١,٥	١٤	٤,٤	١٦	٢,٩ (٢,٩)
المجموع	١١	١٠٠	٢٧,٨	١٠٠	١٦,٨ (٢,٥)

* المصدر : Clive James ، ١٩٩٨ .

جدول (١٠-٣) المساحات العالمية المزروعة بالنباتات المهندسة وراثيا في أعوام ١٩٩٧ ، ١٩٩٨ : بالمحصول (مليون هكتار) .

المحصول	١٩٩٧	%	١٩٩٨	%	الزيادة	(نسبة)
فول الصويا	٥,١	٤٦	١٤,٥	٥٢	٩,٤	(٢,٩)
الذرة	٣,٢	٣٠	٨,٣	٣٠	٥,١	(٢,٦)
القطن	١,٤	١٣	٢,٥	٩	١.١	(١,٨)
الكانولا	١,٢	١١	٢,٤	٩	١,٢	(٢,٠)
البطاطس	أقل من ٠,١	أقل من ١	أقل من ٠,١	أقل من ١	أقل من ٠,١	–
المجموع	١١	١٠٠	٢٧,٨	١٠٠	٢٦,٨	(٢,٥)

جدول (١٠-٤) : المساحات العالمية للمحاصيل المهندسة وراثيا في أعوام ١٩٩٧ ، ١٩٩٨ من بلد لآخر (مليون هتكار)

البلد	١٩٩٧	%	١٩٩٨	%	الزيادة ٩٨/٩٧	(نسبة)
أمريكا	٨,١	٧٤	٢٠,٥	٧٤	٢,٤	٢,٥
الأرجنيتن	١,٤	١٣	٤,٣	١٥	٢,٩	٣,٠
كندا	١,٣	١٢	٢,٨	١٠	١,٥	٢,١
أستراليا	٠,١	١	٠,١	١	أقل من ٠,١	١,٠
المكسيك	أقل من ٠,١	أقل من ١	أقل من ٠,١	أقل من ١	أقل من ٠,١	–
أسبانيا	صفر	صفر	أقل من ٠,١	أقل من ١	أقل من ٠,١	–
فرنسا	صفر	صفر	أقل من ٠,١	أقل من ١	أقل من ٠,١	–
جنوب إفريقيا	صفر	صفر	أقل من ٠,١	أقل من ١	أقل من ٠,١	–
المجموع	١١	١٠٠	٢٧,٨	١٠٠	١٦,٨	٢,٣

جدول (١٠-٥) : المساحات العالمية للنباتات المهندسة وراثيا أعوام ١٩٩٧ ، ١٩٩٨ : بالصفات الوراثية (مليون هكتار) .

الصفة	١٩٩٧	%	١٩٩٨	%	الزيادة	النسبة
تحمل مبيد الحشائش	٦,٩	٦٣	١٩,٨	٧١	١٢,٩	٢,٩
مقاومة الحشرات	٤,٠	٣٦	٧,٧	٢٨	٣,٧	١,٩
مقاومة الحشرة وتحمل مبيد الحشائش	أقل من ٠,١	أقل من ١	٠,٣	١	٠,٢	—
صفات الجودة	أقل من ٠,١	أقل من ١	٠,١	١	أقل من ٠,١	—
المجموع	١١	١٠٠	٢٧,٨	١٠٠		٢,٥

جدول (١٠-٦) : المحاصيل المهندسة وراثيا السائدة عام ١٩٩٨

المحصول	المساحة بالمليون هكتار	% نباتات مهندسة وراثيا
فول صويا مقاوم لمبيد الحشائش	١٤,٥	٥٢
ذرة به بكتريا Bt	٦,٧	٢٤
قطن مقاوم للحشرة ومتحمل لمبيد الحشائش	٢,٥	٩
كانولا متحملة لمبيد الحشائش	١,٧	٦
المجموع	٢٧,٨	١٠٠

جدول (١٠-٧) : سبعة دول قدمت محصول مهندس وراثيا عام ١٩٩٨

البلد	المحصول	الصفة	المساحة (هكتار)
الصين	القطن	مقاومة الحشرات	٦٣٠٠٠
أسبانيا	الذرة	مقاومة الحشرات	٢٠٠٠٠
الأرجنتين	الذرة	مقاومة الحشرات	١٧٠٠٠
جنوب إفريقيا	القطن	مقاومة الحشرات	١٢٠٠٠
أمريكا	الذرة	تحمل المبيد / مقاومة الحشرات	١٢٠٠٠
أمريكا	فول الصويا	جودة الزيت	١٠٠٠٠
الأرجنتين	القطن	مقاومة للحشرات	٨٠٠٠
جنوب إفريقيا	الذرة	مقاومة للحشرات	٣٠٠٠
فرنسا	الذرة	مقاومة للحشرات	٢٠٠٠
المكسيك	القطن	تحمل المبيد / مقاومة الحشرات	١٠٠٠
أمريكا	البابايا	مقاوم للفيروس	٢٠٠
المجموع			**١٥١٢٠٠**

جدول (١٠-٨) : الفوائد المقدرة لانتخاب المحاصيل المهندسة وراثيا فى الولايات المتحدة الأمريكية وكندا فى عام ١٩٩٧ .

	مساحة النباتات المحولة وراثيا (هكتار)	المساحة القومية للنباتات المهندسة (%)	الفوائد مليون دولار
*** فى أمريكا**			
فول صويا مقاوم لمبيد الحشائش	٣,٦	١٢,٦	٢٠٩
ذرة Bt	٢,٨	٨.٨	١١٩
قطن Bt	١,٠	١٧,١	١٣٣
قطن متحمل للمبيد	٠,٣	٥,٧	٥
بطاطس Bt	أقل من ٠,١	٢,٤	أقل من ٠,١
المجموع	٧,٧		٣٦٦
*** كندا**			
كانولا مقاوم للمبيد	١,٢	١٢,٦	٤٨
ذرة Bt	٠,١	٢٦,٠	٥
بطاطس Bt	أقل من ٠,١	٣,٠	أقل من ٠,١
المجموع	١,٣		٥٣
المجموع الكبير	٢١,٧		٤١٩

جدول (١٠-٩) : حجم السوق للنباتات المهندسة وراثيــا فــى أعــوام ١٩٩٦ ، ١٩٩٧ ، ١٩٩٨ .

السنة		الزيادة بالدولار	الزيادة %
١٩٩٥	٧٥		
١٩٩٦	٢٣٥	١٦٠	+ ٢١٣
١٩٩٧	٦٧٠	٤٣٥	+ ١٨٥
١٩٩٨	١٢٠٠-١٥٠٠	٥٣٠-٨٣٠	+٧٩-١٢٤

جدول (١٠-١٠) : مقارنة بين مساحات وإنتاجية المحاصيل المختارة شمال أمريكا (أمريكا وكندا) فى مقابل الدول المتقدمة (مليون هكتار) .

المحصول	الدول النامية (DC)	شمال أمريكا (NA)	النسبة DC/NA	المحصول
الأرز	١٤٥	١	١٤٥	١,٨
القمح	١٠٤	٣٧	٣	١,٠
الذرة	٩١	٣١	٣	٢,٩
فول الصويا	٣٧	٢٩	١	١,٤
القطن	٢٥	٥	٥	١,٣
البطاطس	٨	٠,٦	١٣	٢,٨
زيت الشـــلجم / كانولا	١٥	٥	٣	١,٢
الطماطم	٢	٠,٢	١٠	٢,٦
المجموع	٤٢٧	١٠٩		

جدول (١٠-١١) : استثمارات بعض الشركات الكبرى فى التكنولوجيا الحيوية لإنتاج التقاوى ومدخلات وقاية المزروعات وعلوم الحياة ١٩٩٥ – ١٩٩٨ .

الشركة	بليون دولار		بليون دولار
مونسانتو	٨,٦	داو / أجرسينس	٠,٨
بيوتير / ديبونت	١,٧	كراجيل / مونسانتو	٠,٢
ديبونت	١,٥	شركات أخرى	١,٥
أجريفو	١,٥		١٧,٠
سيمنز	١,٢		
الاجمالى		١٧,٠	

فيما يلى ثلاث جداول للمحاصيل المهندسة وراثيا التى ووفق على السماح بتداولها فى مصر وسوف أتركها باللغة الإنجليزية .

جدول (١٠-١٢) : تسجيلات النباتات المهندسة وراثيا فى مصر

Submitted	Approved	Crop	Trait	Applicant	Aplications
1/9/96	24/12.96	Musk meion, Squash	Resistance to ZYMV	AGERI/MSU	Biocontalinment
9/9/96	24/12/96	Potato	Resistance to PTM	AGERI/MSU	Biocontaminant
25/9/96	24/12/96	Potato	Resistance to PLRV	AGERI/ Scottish Crop Res. Inst.	Biocontaminant
9/10/96	24/12/96	Potato	Resistance to PTM	AGERI/MSU	Biocontaminant
25/10/96	24/12/96	Tomato	Resistance to TYLCV	AGERI/ILTAB/ MSU	Open field
21/11/96	24/12/96	Potato	Resistance to PTM	AGERI/MSU	Open field
15/11.96	24/12/96	Sugarcane	Resistance to Mosaic Virus	Sugar Crops Res. Inst.	Biocontaminant
1/12/96	24/12/96	Musk meion, Squash	Resistance to ZYMV	AGERI/MSU	Open field
8/12/96	24/12/96	Potato	Resistance to PTM	AGERI/MSU	Biocontaminant
10/12/96	24/12/96	Tomato	Resistance to TYLCV	AGERI-ILTAB/ MSU	Biocontaminant
28/1.99	6/5/99	Cucumber	Resistance to ZYMV	AGERI	Open field
27/4/99	Pending	Maize	Resistance to Corn-borers	Verneuli Semences	Open field

جدول (١٠-١٣) : تسجيلات النباتات المهندسة وراثيا في مصر

Submitted	Approved	Crop	Trait	Applicant	Aplications
12/0/97	22/11/97	Potato	Resistance to PVY	AGERI/MSU	Open field
15/10/97	22/11/97	Potato	Resistance to PTM	AGERI/MSU	Open field
10/11/97	22/11/97	Musk meion, Squash	Resistance to ZYMV	AGERI	Open field
14/11/97	22/11/97	Musk meion, Squash	Resistance to ZYMV	AGERI	Open field
17/11/97	22/11/97	Squash	Resistance to ZYMV	AGERI/MSU	Biocontaminant
1/10/98	24/11/98	Rec. DNA Construct	FMOV	Theodore Bilharz Res. Inst.	Biocontaminant
7/10/98	24/11/98	Potato	Resistance to PLRV	Max-Planck	Open field
10/10/98	24/11/98	Potato	Resistance to PTM	AGERI/MSU	Open field
4/5/98	7/7/98	Maize	Resistance to Corn-borers	Novartis/Fine Seeds Int.	Biocontaminant
27/10/98	24/11/98	Maize	Resistance to Corn-borers	Pioneer Hibred	Biocontaminant
28/1/99	6/5/99	Squash	Resistance to ZYMV	AGERI	Biocon. Open field
28/1/99	6/5/99	Squash	Resistance to ZYMV	AGERI	Biocon. Open field
28/1/99	6/5/99	Meion	Resistance to ZYMV	AGERI	Open field

جدول (١٠-٤) : تسجيلات النباتات المهندسة وراثيا فى مصر (تبعا للمحصول)

Crop	Trait	# of Appli-cations	Date submitted	Date approved	Company of institute
Potao	Resistance to PLRV	6	9/9/96 9/10/96 21/11/96 8/12/96 15/10/97 10/10/96	24/12/96 24/12/96 24/12/96 24/12/96 22/11/97 24/11/98	AGERI/MSU
Potato	Resistance to PLRV	2	25/9/96	24/12/96	AGERI/Scottish Crop
			7/10/96	24/11/96	Resistance Institute AGERI/Max. Planck Institute
Tomato	Resistance to TYLCV	1	16/10/96	24/12/96	AGERI/ILTABU/MSU
Squash	Resistance to ZYMV	7	1/9/96 1/12/96 10/11/97 14/11/97 17/11/97 28/1/99 28/1/99	24/12/96 24/12/96 22/11/97 22/11/97 22/14/97 6/5/99 6/5/99	AGERI/MSU
Maize	Resistance to Cornborers	3	4/5/98 28/10/98 28/1/99	7/7/98 24/1/98 Pending	Novaris/Fine Seeds International Pioneer Hibred Verneuil Senences
Recombi-nant DNA construct	Foot & Mouth disease Virus EMOV	1	7/10/98	24/11/98	Theodore Bilharz Research institute
Cucumber	Resistance to ZYMV	1	28/1/99	6/5/99	AGERI
Meion	Resistance to ZYMV	1	28/1/99	6/5/99	AGERI

جدول (١٠-١٥) : استخدام التكنولوجيا الحيوية فى ٥٠ دولة إفريقية فى المعاهد البحثية

المحصول	أعداد التطبيقات للطرق الخاصة					
	ميكروبيولوجي	زراعة أنسجة			هندسة وراثية	المجموع
الحبوب	٤	٧	١٦		١٤	٤٤
المحاصيل الجذرية	٥	٤٤	٣	٧	٨	٦٧
الفواكه والخضراوات	٥	٢٦	٢	١٠	٥	٤٨
البقوليات	٦	٢	٤	٥	٤	٢١
المحاصيل النقدية	١	٢٢	٦	٤	–	٣٣
الغابات	–	٥	١	–	–	٦
محاصيل أخرى	٣	٤	–	٢	٢	١١
المجموع	٢٤	١١٠	٣٢	٣١	٣٣	٢٣٠

مأخوذ من ISNAR ملخص ورقة ٢٣ - فبراير ٢٠٠٠

REFERENCES

Ames, B.N., Profet, M. and Gold, L.S. (1990). Nature's chemicals and synthetic chemicals: comparative toxicology. Proc. Natl. Acad Sci. USA 87: 7782-7786.

Berg, D. and Howe, M. (1989). Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington.

Bhat, S.R. and Chopra, V.L. (1998). Biosafety of transgenic crops: Precautions for case-by-case risk assessment Curr. Sci. 74: 16-17.

Boulter, D. (1995). Plant biotechnology: facts and public perception. Phytochemistry 40: 1-9.

Brill, W.J. (1985). Safety concerns and genetic engineering in agriculture. Science 227: 381-384.

Candelier-Hafvey, P. and Hull, R. (1993). Cucumber mosaic virus genome is encapsidated in alfafa mosaic virus coat protein expressed in transgenic plants. Transgenic Research 2: 277-285.

Davis, B. (1987). Bacterial domenstication: underlyisng assumption. Science 235: 1329-1335.

De Block, M. (1993). The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for plant breeding. Euphytica 71: 1-14.

Flavell, R.B. (1994). Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91: 3490-3496.

Franck-Oberaspach, S.L. and Keller, B. (1997). Consequenc3es of classical and biotechnological resistance breeding for food toxicity and allergenicity. Plant Breed. 116: 1-17.

Grobstein, C. (1977). The recobinant-DNA debate. Scientific American 237(1): 22-33.

Hull, R. (1994). Resistance to plant viruses: obtaining genes by nonconventional approaches. Euphytica 75: 195-205.

Ibarra-Perez, F., Ehdaie, B. and Waines, J.G. (1997). Estimation of outcrossing rate in common bean. Crop Sci. 37: 60-65.

Jorgensen, R.B. and Andersen, B. (1994). Spontaneous hybridization between oil seed rape (Brassica napus) and weedy B. campestris (Brassicaceae): A risk of growing genetically modified oil seed rape. Am. J. Bot. 81: 1620-1626.

Miller, H.I.,, Altman, D.W., Barton, J.H. and Huttner, S.L. (1995). An algorithm for the oversight of field trials in economically developing countries. Bio/Technology 13: 955-959.

OECD. (1986). Recombinant DNA Safety Coinsiderations for Industrial, Agricultural and Environmental Applications of Organisms Derived by Recombinant DNA Techniques, Paris, France.

Rissler, J. and Mellon, M. (1993). Perils Amidst the Promise: Ecological Risks of Transgenic Crops in a Global Market. Union of Concerned Scientist. Cambridge, Massachusetts.

Stam, M., Mol, J.N.M. and Kooter, J.M. (1997). The silence of genes in transgenic plants. Ann. Bot. 79: 3-12.

Todd, J.J. and Vodkin, L.O. (1996). Duplication that suppresses and deletions that restore expression from a chalcone synthase multigene family. Plant Cell 8:687-699.

Wen, F. and Lister, R.M. (1991). Heterologous encapsidation in mixed infections among four isolates of barely yellow dward fivurs. J. Gen. Virol. 72: 2217-2223.

Zitnak, A. and Johnston, G.R. (1970). Glycoalkaloid content of B 5141-6 potates. Am. Potato J. 47: 265-260.

الباب الحادى عشر
النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس Bt : التقدم والمنظور*

مقدمـــــــة :

الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية النباتية فتحت العديد مـن الفـرص لتحسـين النباتات بتقديم حلول جديدة للمشاكل المستعصية منذ زمن بعيد . من أكبر العوامل الكـبرى غير الثابتة التى تؤثر على إنتاجية المحاصيل تلك التى تعنى بالإصابة بالحشـرات . الفقـد الشامل العالمى من الآفات الحشرية يصل لحوالى ٢٠ – ٣٠% من جملة الإنتاج الزراعـى بالرغم من استخدام وسائل حماية النباتات التى تشمل المبيدات الحشـرية الفعالـة (James وآخرون ، ١٩٩١) . لقد أدى الاستخدام المكثف للمبيدات الى ظهور مشاكل خطـيرة مـن جراء الانهيار البيئى وصحة الإنسان . الهندسة الوراثية للنباتات لتحقيق المقاومة للحشـوات تمثل فرصة جذابة لتقليل الضرر الذى تحدثه الحشرات ومن ثم تقلل من استخدام مبيـدات الآفات (Kumar and Sharma ، ١٩٩٤) . جزئيات المبيدات الحشرية الفعالة يمكن أن توجد فى كائنات حية متنوعة والتى إذا أنتجت بتركيز فعال فى النباتات يمكـن أن تحـدث مقاومة للحشرات . فى الحقبة الزمنية الأخيرة تم تحقيق نجاح مشهود فى تطوير النباتـات المقاومة للحشرات مما أدى الى بداية التسويق التجارى للنباتات المهندسة وراثيا عام ١٩٩٦ (Krattiger ، ١٩٩٧) . لقد تم إختبار مجموعة من الجينات المشفرة لأقسام مختلفـة مـن البروتينات ذات التأثيرات كمبيدات حشرية مثل مثبطات البروتييز والليكتينـات ومثبطـات الأميلييز وتوكسينات فينوم العقرب وانزيمات التخليق الحيوى للسيتوكيتنيات والكوليسـترول اكسيديز والكتينيز والجاما إندوتوكسينات للباسـيلليس ثورينجينسـيز (Bt) فـى مكافحـة الحشرات . من بين هذه البروتينات ما يختص بالبروتينات البللورية التى تبيد الحشرات مـن بكتريا Bt والتى أظهرت اقتدار وكفاءة عالية بسبب كفاءتها والتخصص علـى الحشـرات ونقص النشاط فى الثدييات وغيرها من الكائنات الحية . فى هذا المقام سوف تناقش التقـدم الحديث الذى تحقق فى تطوير النباتات المحورة وراثيا باستخدام جينات Bt .

A.D. Mandaokar , P. Anand Kumar , V.S. Malik* and R.P.Sharma*

National Research Center on Plant Biotechnology , Indian Agricultural Research Institute , New Delhi 110012 , India

*APHIS United States Department of Agriculture , 4700 River Road , Riverdale , MD 20737 , UDA .

البروتينات القاتلة للحشرات فى بكتريا الباسيلليس ثورينجينسيز

بكتريا الباسيلليس ثورينجينسيز عبارة عن بكتريا تسكن التربة موجبة لجرام وهـى تنتج بلورات داخلية عند التجرثم . فى بدايات القرن العشرين وجد أن هـذه البكتريـا لـها تأثيرات إبادية على الحشرات (Berliner ، ١٩١٥) . بعد سنوات تم الكشف عن نشاطها وفعلها على الحشرات يرجع الى بروتينات موجودة فى البللورات وقد أطلق عليها بروتينات بللورية كمبيدات "insecticidal crystal proteins" (ICPs) . منـذ ذلـك الوقـت استخدمت سلالات Bt والجراثيم والبللـورات و ICPs كمبيـدات حشـرية حيويـة فـى مستحضرات تجارية . التخصصية والأمان البيئى لمبيدات الحشرات Bt حفزت البحـوث لسلالات جديدة Bt تنتج توكسينات ضد آفات حشرية أكثر . سلالات مبيدات Bt فعالة ضد حشرات حرشفية الأجنحة وغمدية وثنائية الأجنحة (Hofte and Whiteley ، ١٩٨٩) . بالرغم من التجانس الكبير الذى وجد بين الجينات التى تشفر مختلف البروتينـات السـامة TCPs لقسم خاص من الحشرات فان الحساسية فى حشرات خاصة لناتج جين Bt قريـب فى الغالب تكون مختلفة جدا (Van Frankenhu zen ، ١٩٩٢) . بلورات مبيدات Bt (Cry) البروتينية تم تقسيمها الى ١٧ عائلة (جدول ١١-١) بناء على تركيـب الحمـض الأمينى (Crickmore وآخرون ، ١٩٩٥) . جينات البكتريا Bt والتى شفرت لبروتينـات بللورات المبيدات ICPs أوضحت تجانس قوى فى بعض الأوساط المحفوظـة (Bravo ، ١٩٩٧) . جينات مبيدات Bt هذه توجد غالبا على بلازميدات مرتبطة كبيرة وهذا قد يفسـر حركتها الملحوظة بين سلالات البكتريا Bt . سلالة واحدة يمكن أن تحتوى على العديد مـن جينات Cry ونفس الجين يمكن أن يوجد فى سلالات عديدة . العديـد مـن ICPs كـانت حوالى ١٣٠ Kda فى الوزن الجزيئى وتجهز فى المعى الأوسط لصور فعالـة ونشـيطة للتوكسينات حوالى ٦٥ - ٧٥ Kda من خلال نهايات -ن فى البروتينات . تحـدث هـذه التوكسينات سميتها من خلال الارتباط بالخلايا الطلائية للمعى الأوسط ومن ثم تحدث تحلـل فى الأسموزية خلال تكوين الثقب فى غشاء الخلية (Gill وآخرون ، ١٩٩٢) .

لقد لوحظ حديثا أن السوائل الرائقة فى المزارع الرائقة التى تجمـع خـلال النمـو الخضرى لأنواع الباسيلليس غنية فى جزيئات المبيدات الحشـرية (Warren وآخـرون ١٩٩٦ ، Estruch وآخرون ، ١٩٩٦) . السوائل الرائقة لبعض عزلات B.cereus تملك سمية عالية ضد ديدان جذور الذرة المعروف عنها مقاومتها للبروتينـات ICPs . صفـات الإبادة ضد الحشرات ترتبط بنظام مزدوج يطلق على نوعـى الـبروتين Vip1 , Vip2 (بروتين خضرى للمبيد) . على نفس المنوال فان السائل الرائق لبعض مزارع بكتريا Bt له

صفات ابادية عالية ضد الحشرات مثل الدودة القارضة والحفارات (Estrueh وأخــرون ، ١٩٩٦) . لقد أظهرت كلونة وتوصيف الجين بروتين جديد كمبيد حشرى وهــو Vip3A وهو غير متجانس مع أى بروتين معروف . التتـــابع الطرفـــى للنـــتروجين N-terminal لبروتينات Vip تملك عدد من البقايا المشحونة موجبا متبوعة بمنطقة تقب كاره للماء وهـــو مشابه لأية إشارات ببتيدية وصفت لبكتريا باســـيلليس (Estruch وآخـــرون ، ١٩٩٦) . Vips خاص Vip3A تحدث نشاط ابادى ضد الحشرات خاصة حرشفيات الأجنحة . لقـــد أوضحت دراسات المرضية التشريحية للحشرات الحساسة التى تغذت على غذاء مضــــاف إليه Vip3A حدوث شلل فى الأمعاء يتبعه تحلل كامل للخلايا الطلائية فى الأمعــــاء ممـــا يؤدى الى موت اليرقات (Yu وآخرون ، ١٩٩٧) . لقد لوحظ انـــــهيار كـــامل للخلايـــا الطلائية العمادية .

جدول (١١-١) : المجاميع الأولية للاندوتوكسينات فى الباسيلليس ثورينجنيسز وتخصصها الابادى ضد الحشرات

البروتين ICP	التخصص Specificity	البروتين ICP	التخصص Specificity	البروتين ICP	التخصص Specificity
CrylA(a,b,c,d.e)	L	Cry2A(a,b,c)	L,D	Cry9Aa	L
Cry1Ba	L,C	Cry3A	C	Cry9Ba	L
Cry1C(a.b)	L.C	Cry3B(a.b)	C	Cry9Ca	L
Cry1D(a.b)	L	Cry3Ca	C	Cry10Aa	D
Cry1E(a,b)	L	Cry4Aa	D	Cry11Aa	D
Cry1Fa	L	Cry4Ab	D	Cry12Aa	N
Cry1Ga	L	Cry5A(a.b)	N	Cry13Aa	N
Cry1Ha	L	Cry6A	-	Cry14Aa	C
Cry1I(a,b)	L,C	Cry7A(a.b)	C	Cry15Aa	-
Cry1Ja	L	Cry8Aa	C	Cry17Aa	-
		Cry8Aa	C	Cry17Aa	-
		Cry8Ca	C		

L: Lepidoptera; D: Diptera; C: Coleoptera; N: Nematodes.

النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس Bt-transgenic plants

فى أكثر النظم الفعالة التى نشرت ونزلت للأسواق النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس ثورينجينسيز Bt . النظم الأخرى مثل البكتريا Bt المحورة وراثيا ، الكائنات الدقيقة المحورة ، الفيروسات المتحولة Bt وكذلك مستحضرات Bt تعانى من العديد من العيوب الوراثية (Kumar وآخرون ، ١٩٩٦) . التطورات الحديثة فى تكنولوجيا تحول النباتات أدت الى مساعدة الادخال الثابت للجينات الغريبة فى العديد من أنواع المحاصيل الهامة بما فيها ذات الفلقة الواحدة (Dale وآخرون ، ١٩٩٣) . لقد نشر أنه تم تحوير أكثر من ٧٠ نوع نباتى هامة من خلال الهندسة الوراثية . لقد تأكد عندئذ من الاقتدار العالى للهندسة الوراثية للنباتات بما يمكنها من التعبير عن جينات Bt المزروعة . المميزات الهامة لصفة مقاومة الحشرات التى هندست فى النباتات تشمل :

١-تحقيق حماية طوال الموسم بصرف النظر عن الظروف الجوية .

٢-مكافحة فعالة ضد الحشرات المدفونة والمختبئة والتى يصعب الوصول اليها بالرش .

٣-مكافحة كل أطوار الحشرة .

٤-الحشرات التى تأكل النباتات هى فقط التى تتعرض للتوكسينات . إحداث المقاومة النباتية ذات مردود اقتصادى لأنها تقلل عناصر التكاليف التى يتحملها الفلاح .

المحاولة الأولى للتعبير بالجاما – اندوتوكسينات فى النباتات استخدمت التتابع الأصلى المشفر من بكتريا الباسيلليس Bt . لقد استخدم الباحث Vaeck ومعاونوه (١٩٨٧) محفز المانوباين سينسيز و ٣ً منطقة الأديناليين المتعدد لجين T-DNA-7 للتعبير عن جين Coyl Ab S-endotoxin . التراكيب التى فحصت فى الدخان شملت الشرائح الطرفية -NH2 التى تشفر ٦٠ حامض أمينى وتركيبين يشفرا انطلاق الترجمة بين شرائح نهايات ن٢يد للكراى 1Ab وجين npt II . مستويات الجاما – اندوتوكسين التى تم التعبير عنها فى النباتات المحتوية على البروتينات العارية أو بروتينات الانتشار تتراوح من ٢,٦-١٩٠ نانوجرام كريل Ab1 / مللجم بروتين ذائب أو ٠,٠٠٠٢ - ٠,٠٢% من البروتين الكلى الذائب . لقد قام Barton وآخرون بتحليل التعبير الخاص بجين الكريل A1 الأصلى فى الدخان باستخدام الجين كامل الطول والجين عديم الأذرع المشفر لبروتين الحمض الأمينى ٦٦٤ . كلا الاقترابان استخدما المنشط CaMv35S , UTL – 5 لفيروس موزايك البرسيم

RNA ومنطقة النوبالين سينسيز عديدة الأدينالية . لم يوجد نبات واحد من تلك التى حولت وراثيا بالجين كامل الطول ينتج مستوى يمكن الكشف عنه من بروتين Bt . تحليل بلوتات نورثرن لهذه النباتات أوضح وجود أنواع mRNA أقصر من النسخ من الجين كامل الطول مع شرائح أقصر مميزة وجود mRNA غير الكاملة فى النباتات المتحولة وراثيا ترجع الى عدم كفاية عمليات ما بعد الاستنساخ أو العودة السريعة للنسخ كامل الطول .

لقد قام Fischhoff وآخرون (١٩٨٧) بتحويل الطماطم مع جين كريل Ab1 الأصلى . لقد استخدم طرازان عديمى الأذرع من الجين واحد يشفر بروتين ٤٦٤ حمض امينى والآخر بروتين ٧٢٥ حمض أمينى . كل طراز أشتق من أو بواسطة محفز CaMV35S و ٣- عديد الأدينالية كمنطقة من جين النوبالين سينسيز . التعبير عن شريحة NU2 الطفرة فقط لجين الجاما – اندوتوكسين انتج نباتات ذات نشاط ابادى على الحشرات. كذلك أدى إدخال الكريل nptII – Ab فى نباتات البطاطس الى تحقيق نشاط ابادى قليل ضد الحشرات (cheng وآخرون، ١٩٩٢) . لقد تم إدخال جين نشيط كريل III يبدأ من الحمض الأمينى ٤٨ فى نباتات الطماطم والبطاطس . لقد كانت مستويات التعبير فى هذه النباتات قليلة جداً اى أقل من ٠,٠٠١% من البروتين الذائب الكلى . لقد أوضحت الدراسات التى أجريت على نباتات الطماطم والبطاطس المتحولة وراثيا مع نهايات NH2 لجين Bt كريل Ab I أن نباتات الطماطم المتحولة أنتجت حوالى ٥٠ نانوجرام كريل Ab 1 لكل جرام من نسيج الورقة (Fischhoff وآخرون ، ١٩٨٧) . بينما أنتجت نباتات البطاطس ٩٠-١٥٠ نانوجرام كريل 1Ab لكل جرام من نسيج الورقة (Peferoen ، ١٩٩٢) .

التعبير عن جين الاندوتوكسين الأصلى كريل 1Ab فى الدخان النامى فى الحقل تم توصيفه بواسطة Carozzi وآخرون ، ١٩٩٢ . لقد تم دراسة ستة خطوط دخان مهندسة وراثيا تعبر عن الحمض الأمينى ٦٤٥ فى بروتين Cry7 Ab من الجين الأصلى عديم الأذرع تحت سيطرة المحفز CaMV 35 S ومع تتابعات ٣-عديدى الأدينالية . لقد زادت مستويات الجاما – اندوتوكسين خلال التطور النباتى مع زيادة محسوسة عند الازهار . مستويات الكراى Ab 1 عند الأزهار تراوحت من ٤٠٠ – ١٠٠٠ نانوجرام لكل جرام وزن جاف أو حتى ٠,٠١% من البروتين الذائب الكلى . الحمض النووى mRNA لاندوتوكسين Bt ذات الحجم المتوقع تم الكشف عنه بسهولة ولكن كان هناك RNAs متميزة عديمة الأذرع . لقد لوحظ النسخ العارى فى النباتات يسبب رسالة أو شفرة عدم ثبات اكثر منها فى حالة النسخ بسبب العمليات غير المناسبة .

إن استخدام الكودون فى جينات الجاما اندوتوكسين الأصلية يختلف بشكل كبير عن تلك التى وجدت فى الجينات النباتية الأساسية . الجينات الخاصة بالاندوتوكسين الأصلية تميل الى محتواها المخفض من Gtc كما فى الذرة (Murray وآخرون ، ١٩٩١) . جين الجاما اندوتوكسين عديم الأذرع يستنسخ فى النباتات المهندسة الوراثية قد ينتج من عدد من الأحداث ترتبط بمحتواها العالى من A+T . هذه تشمل إنهاء النسخ غير الناضج أو الدينالية المتعددة فى المناطق ذات المحتوى العالي من A+T أو الانقسام غير المناسب أو الوصل غير المناسب . عدم ثبات mRNA قد يكون ناتجا مع الانهيار النووى الداخلى أو الخارجى عند تتابعات خاصة تفقد ثبات الرسالة خلال الاستنساخ أو يخلق توقف مؤقت بسبب تكوين تركيبات ثانوية . عدم ثبات mRNA قد يكون ناتجا كذلك من النقل غير الفعال بسبب الاستخدام غير الجيد للكودون .

لكى نوضح المشاكل المذكورة أعلاه ولتحقيق تعبير عالى عن جينات التحول Bt فى النباتات أجريت العديد من المحاولات لتحوير تتابع النيوكلوتيد للجينات الأصلية دون تدخل فى ناتج البروتين . فى تصميم الجين المخلق للتعبير فى النباتات يجب أن تؤخذ العوامل التالية فى الاعتبار :

١-التتابعات التى تتداخل مع كفاءة تعبير الجينات يجب أن تزال ويتخلص منها . مثل هذه التتابعات تشمل الإشارات النباتية العديدة الأدينالية مثل : AATAAA , AATAAG , GATAAA , AATATT , AATAA , .

٢-تتابع نهاية البوليميريز CAN7-9 AGTNNAA II . لقد اتضح أن هذا التتابع يكون تاليا لنهاية 3 فى منطقة التشفير لجينات UZ snRNA هذا هام فى التحوير فى جينات Bt إذا وجد .

٣-إن CUUCGG hairpins مسئولة عن الثبات غير العادى للتراكيب الثانوية للحامض النووى RNA المرتبطة بمختلف العمليات البيوكيميائية الثبات الاستثنائى لدبابيس الشعر CUUCGG أدت الى الاقتراح بأنها قد تكون ذات تركيب غير عادى وقد تكون ذات وظيفة فى تنظيم الثنى المناسب للتراكيب المعقدة للحامض النووى RNA . هذه التتابعات التى تؤثر على mRNA وعملياتها فى الخلايا النباتية تحتاج لتحوير .

٤-أماكن الوصل فى النبات GTAGT : AAG = 5 و (PU) TTTT = 3 TTT(PU)T(PU)TGCAC:C (حيث P = البيورين) قد توجد فى جينات الباسيلليس Bt وهذه يجب التخلص منها .

٥-التحويرات فى تتابع النيوكلوتيد لجين Bt الذى يشفر المنطقة قد يعمل لتقليل محتوى A+T فى تركيب الأساس للدنا DNA . بكتريا Bt المخلقة تصمم كى تحتوى على A+T حوالى ٥٠% وهى النسبة التى توجد فى العادة فى النباتات.

٦-عندما يخلق الجين لتحسين التعبير فى خلية عائل غريب يكون مطلوبا تصميم الجين حتى نصل الى أن تكراريته فى اقترابات استخدام الكودون تقارب تكراريته فى استخدام الكودون المفضل لخلايا العائل .

عندما أخذت هذه العوامل الستة فى الاعتبار قام علماء شركة مونسانتو بتصميم جينات Bt وأجروا دراسات رائدة للتعبير عن جينات كراى 1Ab وكراى 1Ac المحورة جزئيا أو المحورة بشكل كامل (مخلقة) من نباتات القطن (Perlak وآخرون ، ١٩٩٠ ، ١٩٩١) . لقد زاد مستوى البروتين القاتل للحشرات فى الخلايا النباتية بمقدار ١٠٠ مرة مما أدى الى تحقيق مكافحة فعالة لديدان اللوز (جدول ١١-٢) . لقد حدث نفس الشيء مع الجين المشفر ICP ، كراى III A فى البطاطس لتحقيق الحماية ضد الضرر الذى تحدثه خنفساء الكلورادو (.Adang وآخرون ، ١٩٩٣) . لقد أمكن تحقيق تحسين فى التعبير عن جين كراى III A من خلال زيادة محتواه الشامل من G/C من ٣٦% الى ٤٩% . لقد استتبع هذه النجاحات تطوير العديد من المحاصيل المهندسة وراثيا لأنواع من جينات ICP المخلقة تحت سيطرة محفزات مختلفة . لقد تحققت نجاحات فى الذرة والأرز وفول الصويا (جدول ١١-٢) . بناء على موافقة وتصريح Ap HIS (فبراير ١٩٩٥) تم السماح بإجراء اختبارات حقلية على ١١ نوع نباتى هندست وراثيا بجينات ICP فى الولايات المتحدة الأمريكية . هذه النباتات التفاح ، الكانولا ، الذرة ، القطن ، البطاطس ، الأرز ، الدخان ، الطماطم ، اللوز ، الحور . فى المستقبل القريب سوف تختبر العديد من الأصناف النباتية المحورة وراثيا .

جدول (١١-٢) : النباتات المهندسة وراثيا بجينات Bt المخلقة

Plant	Gene	G+C content (%)	*Bt* protein content (% of soluble protein)	Target insect	Reference
Cotton	*cry1Ab/ cry1Ac*	49	0.1	*Heliothis zea Pectinophora gossypiella*	Perlak et al. 1990
Potato	*cry3A*	49	0.3	*Leptinotarsa decemlineata*	Perlak et al. 1993
Maize	*cry1Ab*	65	0.17	*Ostrinia nubilalis*	Koziel et al. 1993
Rice (japonica)	*cry1Ab*	59	0.05	*Chilo suppressalis*	Fujimato et al. 1993
Rice (indica)	*cry1Ac*	45	0.025	*Scirpophaga incertulas*	Wunn et al. 1996 Nayak et al. 1997
Tomato	*cry1Ab*	49	0.3	*Heliothis zea*	Perlak et al. 1991
Tobacco	*cry1Ab*	49	0.03	*Heliothis virescens*	Perlak et al. 1991
Eggplant	*cry1Ab*	59	0.03	*Leucinodes orbonalis*	Kumar et al. 1998
Canola	*cry1Ac*	-	0.4	*Plutella xylostella*	Stewart et al. 1996
Alfalfa	*cry1C*	45	0.2	*Spodoptera lito0ralis*	Strixzhov et al. 1996

تطور المقاومة Resistance development

لقد استخدمت بكتريا الباسيلليس ثورينجينسيز Bt كمبيد حيوى منذ أكثر من حقبتين زمنيتين وكان يفترض أن تطور وتكوين السلالات المقاومة من الحشرات للبكتريا أقل بناء على التقارير الواردة من الكشف عن مقاومة مجاميع الآفات فى الحقول المفتوحة (de barjac وآخرون ، ١٩٨٧) . بالرغم من المقاومة لبكتريا Bt سجلت فى المجاميع الحقلية للفراشة ذات الظهر الماسى (Tabashnik وآخرون ، ١٩٩٠) . هذه التقارير وغيرها أكدت على إمكانية تكوي المقاومة من جراء الانتخاب فى المعمل للوصول الى المقاومة لبكتريا Bt بواسطة العديد من الآفات (Mc Gaughey ، ١٩٨٥ ...) . لقد تم الاستعراض المرجعى لمختلف نواحى مقاومة الحشرات لبكتريا Bt مثل الانتخاب فى المعمل ، تقييم مخاطر المقاومة ، التباينات بين المجاميع الحشرية المختلفة ، تقنيات عبور المقاومة ، الوراثية ، الثبات ، اللياقة وتكاليف وإدارة كل هذه النواحى (Ferre وآخرون ،

١٩٩٥) . فى هذا المقام سوف نتناول بعض تقنيات المقاومة واستراتيجيات السيطرة وإدارة عملية التطور .

الضغط الانتخابى المكثف لمجاميع الحشرات أدت الى تطور فظيع للمقاومة . يمكن أن تتحقق المقاومة بتقنيات مختلفة تتراوح من نقطة هضم السم الأولى Protoxin digestion الى إدخال التوكسين فى الغشاء . العوامل التى تؤثر على ارتباط التوكسين للمستقبل قد تؤدى الى مقاومة اختيارية . من جهة أخرى فان المقاومة الناتجة من التغييرات عند الخطوات الشائعة مع كل التوكسينات مثل التحلل البروتينى للسموم الأولية والتغيرات التوجيهية واختراق الغشاء سوف تؤدى الى مقاومة مشتركة للأقسام المختلفة لتوكسينات البكتريا Bt . الدراسات التى أوضحت أن رقم حموضة المعى الأوسط وطبيعة البروتيزيس يحتمل أن تشترك فى إحداث المقاومة (Oppert وآخرون ، ١٩٩٤) . لقد تم خفض الارتباط لتوكسين Bt للغشاء الخارجى للطبقة الطلائية للمعى الأوسط وتعريفه كتقنية لحدوث المقاومة لحشرة اليلوديا انتربنكتلا (Van Rie وآخرون ، ١٩٩٠) . والبلوتيلا زايلوستيلا (Ferre وآخرون ، ١٩٩١ ، Bravo وآخرون ، ١٩٩٢ أ ، ب) . أوضحت الدراسات التى استخدم فيها الكراى 1 Ab المعلم إشعاعيا حدوث خفض ١٠٠ مرة فى السمية فى النسبة بين السلالة المقاومة والحساسية للبلوديا أنتربنكتيلا . أظهرت سلالة D.xylostella من الفلبين حدوث ٢٠٠ مرة فى المقامة للكراى 1Ab ولم يحدث أو حدث بشكل قليل ارتباط إلتوكسين للغشاء الطلائى للمعى الأوسط بالمقارنة بالسلالة الحساسة .

على عكس النتائج التى تحصل عليها من يلوديا انتربنكتللا وحشرة بلوديا زيلوستيللا وفى تجارب مستقلة على دودة اللوز الشوكية وجد عدم وضوح فى الارتباط بين ارتباط التوكسين والمقاومة للكراى 1Ab أو الكراى 1Ac (Gouldl وآخرون ، ١٩٩٤ ، McIntosh وآخرون ، ١٩٩١) . الدليل الوحيد ضد اشراك خطوة الارتباط فى تقنية كلا المقاومة والتخصصية تم توصيفه (Wolfersberger ، ١٩٩٠) . لقد وجد الباحث أن Lymantria dispar وجود ارتباط سالب بين القابلية للارتباط والسمية فى نوعين مختلفين من توكسينات Bt تجاه سلالة فردية من الحشرة . لذلك اتفق على أنه كلما زادت ارتباط البروتين السام كثيرا قلت القابلية عما هو الحال مع البروتينات الأقل سمية . أظهرت نتائج Wolfersberger توافقه مع الفكرة بوجود اختلافات فى السمية وكذلك اختلافات فى القدرة على الارتباط .

من الملاحظات الهامة ذات المعنوية تطور المقاومة فى اليلوديا انتربنكتيللا للتوكسينات المتعددة (McGaughey and Johnson ، ١٩٩٢) . التكرارية الملحوظة

لحدوث المستعمرات المقاومة من الحشرة يبدو أنها كانت عالية جدا لنوعين من الطفرات المستقلة كل منها تغير مستقبل متخصص لكي يحدث توافقيا فى الحشرة . من الممكن ان المقاومة التى ترجع الى طفرة فى موقع واحد تنتج أنواع من التوكسينات غير فعالة كما هو الحال مع دودة اللوز الأمريكية ذات المقاومة الواسعة (Gould وآخرون ، ١٩٩٢) . من الممكن كذلك أن هذه المستقبلات لحد ما تتداخل أو تكون كالعنقود لدرجة أن الطفرة الفردية تؤثر على صفات الارتباط للتوكسينات العديدة . لقد لوحظ حديثا أن الجين المنفرد كان مسئولا عن حدوث المقاومة فى الفراشة ذات الظهر الماسى (DBM) لأربعة بروتينات Tabashnik) BT وآخرون ، ١٩٩٧) . من المطلوب بذل مجهودات أكبر لمعرفة كيفية إحداث فعل التوكسين حتى يمكن فهم أساس تطور المقاومة والتعامل مع المشاكل العملية الخطيرة إذا جاء الوقت الذى تستخدم فيه بكتريا Bt بشكل مكثف .

إدارة المقاومة Resistance management

مع عقلانية وحقيقة أن الحشرات يمكن أن تطور المقاومة للباسيلليس Bt . تركز الجهود الحالية نحو تطوير استراتيجات النشر التى قد تؤخر أو تمنع نشوءه وتطوره . التعبير الخاص ببكتريا Bt فى النباتات المهندسة وراثيا قد تؤدى الى الانتخاب المستمر للآفات فى اتجاه المقاومة الشديدة لأن الحشرات تتعرض للبكتريا Bt حتى لو لم تسبب ضرر اقتصادى (Mallet and Porter ، ١٩٩٥) . لقد اقترحت استراتيجيات مختلفة للتغلب على تطور مشكلة المقاومة وقام بتلخيصها Whalon and McGanghey ، (١٩٩٣) . لقد أدخلت هذه التكتيكات بعد تلك التى استخدمت أو اقترحت فى السيطرة وإدارة المقاومة للمبيدات الحشرية الكيميائية والتى تتضمن إشراك الآتى :

١-دورة وتغيرات التوكسينات .
٢-مخاليط أو تتابعات التوكسينات .
٣-توفير المأوى والملاذ .
٤-الجرعات العالية جدا من التوكسين .
٥-التعبير المؤقت والمكافىء بجينات توكسين Bt فى النباتات المتحولة وراثيا .

١- الدورات Rotations

الدورة أو تغيير توكسينات Bt والمبيدات واستراتيجيات المكافحة الزراعية والحيوية تعتبر من الاقترابات لإدارة المقاومة . يعتمد نجاح هذه التكتيكات على إعادة الحساسية عند وقف الضغط الانتخابى أو التغيير نحو جين آخر أو توكسين أو مبيد حشرى أخر . الدورة بين التوكسينات التى تعبر عن المقاومة المشتركة لكل منها والآفرين ذات قيمة محدودة

(Gould ، ١٩٨٨ ، Gould وآخرون ، ١٩٩٢) . الدراسات التى توضح عدم ثبات المقاومة للباسيلليس Bt فى P.xylostella (Hama وآخرون ، ١٩٩٢) و H.virescers (Sims and Stone ، ١٩٩١) وحالة واحدة من عبور المقاومة السالبة فى P.interpvnctella (Van Rie وآخرون ، ١٩٩٠) أدت الى الاقتراح بان الدورات قد تبطىء من تطور المقاومة فى بعض المواقف . لقد وجد McGavghey and Beemam ، (١٩٨٨) أن المستويات العالية من المقاومة فى P.interp كانت ثابتة لفترات طويلة وفى بعض الحالات قد لا تكون الدورات فعالة .

٢- مخلوط التوكسينات

إن مخلوط التوكسينات يعتبر من التكتيكات البسيطة نسبيا الذى يمكن استخدامه فى التطبيقات التقليدية والنباتات المهندسة وراثيا . يبنى هذا الاقتراب على نظرية الاحتمال والتى توجد إذا كانت المقاومة لكل مكون فى المخلوط نادرة ومن ثم فان الأفراد ذات المقاومة لكل المكونات سوف تكون نادرة أو غائبة . لذلك فان المقاومة المشتركة الشديدة والمكثفة بين توكسينات Bt المختلفة قد تؤدى الى خفض المردود بأن المخلوط سوف يتغلب بشكل فعال على المقاومة (Gould وآخرون ، ١٩٩٢) . العديد من المجاميع الحقلية لحشرة P.xylostellaa سرعان ما تصبح مقاومة لمخلوط فى سلالتان Bt التى تحتوى على الأقل ستة توكسينات كراى 1A ، كراى Cry II , Ic . مطلوب مزيد من البحوث للكشف عن نظام استجابة الأنواع المختلفة من الحشرات لمخاليط Bt قبل وضع التوصيات المناسبة مما يؤكد منع المقاومة .

٣- المأوى Refuges

توفير ظروف معيشة وبقاء الحشرات الحساسة واحد من أفضل الاقترابات فى خفض تطور المقاومة . أظهرت النتائج من دراسات النماذج أن المأوى وهجرة الحشرات الحساسة فى مجاميع الآفة يمكن أن تبطىء من نشوء المقاومة . لقد تأكد وعضد هذا الموقف من نتائج الدراسات المعملية على دودة اللوز الأمريكية وحشرة P.xylostelh . النشر المكانى والمؤقت لإمكانيات المأوى تسهل التزاوج العشوائى بين الحشرات البالغة الحساسة والمقاومة وقد تحد من حركة اليرقات بين النباتات المعاملة ببكتريا Bt وغير المعاملة (Mallet and Porter ، ١٩٩٢) . المأوى المكانى يمكن أن يزود بين الأنسجة داخل النباتات بتأكيد التعبير المتخصص النسيجى لجينات Bt وكذلك بين النباتات داخل الحقل بواسطة زراعة النباتات المهندسة وغير المهندسة وراثيا بنسبة معروفة أو بين الحقول والتى تجاور حقول مزروعة بأصناف نباتية تختلف فى حساسيتها لحشرة معينة .

لقد أشار Denhdm and Rowland ، (١٩٩٢) إلي استراتيجية الجرعة العالية مع أماكن معيشة غير معاملة كوسائل فعالة فى إدارة تطور المقاومة فى النباتات المتحولة وراثيا . هذا الاقتراب يشير الى أنه يقوم بتعديل التعبير المستمر والتركيبى لتوكسينات Bt فى النباتات المتحولة وراثيا وهو يستطيع أن يقتل كل الزيجوتات غير المتجانسة بشكل كافى فى المجموع . هذا الاقتراب غير ممكن مع التطبيق التقليدى لبكتريا Bt لأن الرش على المجموع الخضرى لا يمكن أن يغطى النبات جيدا وبتجانس ومن ثم لا يثبت لفترة كافية لتحقيق التعبير المستمر للبكتريا Bt .

٤- الجرعة فائقة أو متناهية الكبر **Ultra high dose**

يمكن استخدام جرعة متناهية فى الكبر عندما تكون الحشرات المستهدفة حساسة جدا والتعبير الخاص ببكتريا Bt فى النباتات المهندسة وراثيا عالية جدا (١% من البروتين الكلى) . من الممكن تطوير هذه النباتات بتعبير الجينات فى الكلوروبلاست (McBride وآخرون ، ١٩٩٥) . هذه الجرعة عالية بما فيه الكفاية كى تقتل حتى الأفراد المقاومة متجانسة الزيجوتات . هناك شك مستمر بسب أن الجرعة الأعلى حتى ٢٦٨ جم / لتر من مستحضر Bt لا تقتل الأفراد المقاومة من P.xylostella . كما ذكر سابقا فان القابلية للارتباط فى التوكسينات تعتبر التقنية الأولية للمقاومة فى P.xylostella . إذا كانت اقترابات القدرة على الارتباط صفر فان محاولات قتل الحشرات المقاومة باستخدام الجرعة العالية قد تكون غير ذات جدوى (Tabashnik ، ١٩٩٤) .

٥- التعبير الجينى المتحكم فيه **Controlled gene expression**

التعبير المكانى والمؤقت والمحفز لجينات بكتريا Bt فى النباتات المهندسة وراثيا تعتبر واحدة من ملامح استراتيجيات الإدارة ضد الأفات . التعبير التركيبى والمستمر لجينات بكتريا Bt أدت الى ضغط انتخابى معنوى على مجاميع الآفة . التخصص النسيجى (أوراق – سوق – جذور – لوز – براعم – بذور) والتخصص الطورى (خضرى – تكاثرى) وبادئات ومحفزات الجروح الخاصة أصبحت فى المتناول الآن والتى يمكن أن تستخدم لعقلانية وتدوير التعبير الجينى لبكتريا Bt باستخدامها نفسها (Williams وآخرون ، ١٩٩٢) . كل هذه الاقترابات تحتاج الى التأكيد تجريبيا بنظام متجانس . لسوء الحظ فان أى من النباتات المهندسة وراثيا لم تتعرض للتحدى التجريبى للحشرات المقاومة لبكتريا Bt. مازلنا فى حاجة الى مزيد من البحوث والدراسات لتقييم دور سلوك الحشرة وغيرها من العوامل البيولوجية والايكولوجية والوراثية فى تطور المقاومة فى الحشرات لبكتريا Bt والنباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt .

REFERENCES

Dang, M.J., Brody, M.S., Cordineau, G., Eagan, N., Roush, R.T., Shewmaker, C.K. Jones A., Oakes, J.V. and McBride, K.E. (1993). The construction and expression of a Bacillus thuringiensis cryIII A gene in protoplasts and potato plants. Plant Mol. Biol. 21: 1131-1145.

Berliner, E. (1915). Uber die Schlaffsuch der mehlmottenraupe. Z. Angew. Entomol. 2: 29-56.

Bravo, A., Jansen S. and Peferoen, M. (1992). Immunocytochemical localisation of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins in intoxicated insects J. Invertebr. Pathol. 60: 237-246.

Crickmore, N., Ziegler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Lambert, D., Lereclus, D., Gawron-Burke, C. and Dean, D.H. (1995). Revision of the nomenclature of Bacillus thuringiensis cry genes Abstracts of the 28th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology. Bethesda, p. 14.

Dale, P.J., Irwin, J.A. and Scheffter, J.A. (1993). The experimental and commercial release of transgenic crop plants. Plant Breed. 111: 1-12.

Denholm, I. and Rowland, M.W. (1992). Tactics for managing insecticide resistance. Annu. Rev. Entomol. 37: 91-112.

Estruch, J.J., Carozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W. and Koziel, M.G. (1996). Transgenic plants: An emerging approach to pest control. Nature Biotechnology 15: 137-141.

Ferre, J., Escriche, B. Bal, Y. and Van Rie, J. (1995). Biochemistry and genetics of insect resistance to Bacillus thuringiensis. FES Microbiol. Fett. 132: 1-7.

Gould, F. (1988). Genetic engineering pest management and the evolution of pests. Trends Ecol. Evol. 3: 515-518.

Hofte, H. and Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis. Microbiol. Rev. 53: 242-255.

James, W.C., Teng, P.S. and Nutter, F.W. (1991). Estimated losses of crops from plant pathogens. In: D. Pimentel, (ed). CRC Handbook of Pest Management. CRC Press, Boca Raton, Vol. 1, pp. 15-50.

Krattitger, A.F. (1997). Insect Resistance in Crops: A case study of Bacillus thuringiensis (Bt) and its transfer to developing countries ISAAA, Ithaca, NY, pp. 14-16.

Kumar, P.A., Sharma, R.P. and Malik, V.S. (1996). Insecticidal cproteins of Bacillus thuringiensis Adv. Appl. Microbiol. 42: 1-43.

McGaughey, W.H. (1985). Insect resistance to biological insecticide Bacillus thuringiensis. Science 229: 193-195.

McIntosh, S.C., Stone, T.B., Jokerst, R.s. and Fuchs, R.L. (1991). Binding of Bacillus thuringiensis proteins to a laboratory selected line of Heliothis virescens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8930-8933.

Nayak, P., Basu, D., Das, S., Basu, A., Ghosh, D., Ramakrishan, N.A, Ghosh, M. and Sen, S. (1997). Transgenic elite indica rice plants expressing cry1Ac δ-endotoxin gene of Bacillus thuringiensis are resistant against yellow stem borer. (Scripophaga incertulas). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2111-2116.

Oppert, B., Kramer, K.J., Johnson, D.E., McIntosh, S.C. and McGaughey, W.H. (1994). Altered protoxin activation by midgut enzymes from a Bacillus thuringiensis resistant strain of Plodia interpunctella. Biochem. Biophys. Res. Commun. 198: 940-947.

Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T. and Fischoff, D.A. (1990). Insect resistant cotton plants. Bio/Technology 8: 939-943.

Stewart, C.N., Adang. M.J. All, J.N. Raymer, P.L. Ramachandran, S. and Parrott, W.A. (1996). Insect control and doses effects in transgenic canola containing a synthetic Bacillus thuringiensis cry1Ac gene. Plant Physiol. 112: 115-120.

Tabashnik, B.E. (1994). Evolution of resistance to Bacillus thuringiensis. Annu. Rev. Entomol. B9: 47-49.

Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N. and Johnson, M.W. (1990). Field development of resistance to Bacillus thuringiensis in Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83: 1671-1676.

Van Rie, J., McGaughey, W.H., Johnson, D.E., Barnett, B.,D. and Van Mallaert, H. (1990). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide Bacillus thuringiensis. Science 247: 72-74.

Warren, G.w., Koziel, M.G., Mullins, M.A., Nye, G.J. Carr, B., Desai, N., Kostickka, K., Duck, N.B. and Estruch, J.J. 1996. Patent No. WO96/10083.

Yu, C.G., Mullins, M.A, Warren, G.W., Koziel, M.G. and Estruch, J.J. (1997). The Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1532-1536.

الباب الثاني عشر
تقييم تأثيرات وأداء النباتات المهندسة وراثيا والمبيدات الحيوية

أولا : تقييم تأثيرات وأداء النباتات المهندسة وراثيا

مقدمـــــــــــة :

كل كائن حى يعرف من الجينوم الخاص به . الجينوم عبارة عن المجمـــوع الكلـــى للمعلومة الوراثية التى تحملها الكائنات الحية " الحمض النووى " والتـــى تمثـــل مـــع كـــل الكائنات فيما عدا بعض الفيروسات " الحمض النووى الدنا DN " . الصفات traits عبـــارة عن خصائص وراثية يمكن تقديرها بالتعبير (أو عدم التعبير) عن جينات خاصـــة . فـــى المقابل فان الجين ما هو إلا تتابع خاص لقاعدة الدنا . تتابع قاعدة الدنا والـــترتيب الفعلـــى لبقايا A/T/C/G على طول جزىء الدنا تقدم الوصفة أو التركيبة لآلية تخليق بروتين الخلية لترتيب بقايا الحمض الأمينى فى ترتيب خاص . ترتيب بقايا الحمض الأمينى تـــؤدى الـــى إنتاج بولى ببتيد أما ترتيب وتحوير الببتيدات العديدة تؤدى الى تكوين بروتين خـــاص . إن وجود أو غياب البروتين أو مجموعة من البروتينات تقدم الصفات التى نلاحظـــها والتـــى يطلق عليها الفينولوجى أو الطرز الوراثى Phenotype . فى أبسط صورة يصبـــح مـــن المفيد التفكير فى الجينوم على أنه تجميع للتركيب . كل جين يمثل تركيب يتبعه الخلية لعمل بروتين خاص . يمكن ان نتوسع فى هذا التعريف واقتراح أن كل كروموسوم يمثل حجم من التراكيب . حيث أن كتاب التركيب فى العادة يحتوى على معلومات أخرى كما فى التخطيط لوجبة غذاء والتوصيات الخاصة بأى الأطباق التى يتكامل إحداها مع الأخرى والمعلومـــات الغذائية وحيث أن الجينوم أكثر من سلاسل من تراكيـــب الـــبروتين فانـــه يحمـــل كذلـــك معلومات تنظيمية وأخرى . فى هذا المقام سوف نتناول أبسط التراكيب .

الغرض الأساسى من الهندسة الوراثية أو التحسين الوراثى كما يحلو للبعض التسمية يتمثل فى تقديم كائن حى ذات تراكيب إضافية سواء كانت صفات مطلوبة يعانى من عـــدم وجودها أو يضاد الصفات غير المرغوبة الموجودة . يختلف حجم الجينوم بشكل كبير بيـــن الكائنات الحية . حيث أنه فى الإمكان قياس الكمية الطبيعية فى "الدنا" فى الخلية مع الدقـــة المعقولة وليس من السهولة تقدير عدد التراكيب الجينية التى تحملها حيث أن مكون التركيبة للجينوم سوف يختلف تبعا لنوع الكائن وكذلك فان كل تركيبة جين سوف تختلف فى الطول. فى المتوسط فان البروتين التقليدى لمائة حمض أمينى سوف تتطلب ٣٠٠ زوج قاعدة مـــن الدنا المشفر الحقيقى وأزواج قاعدة إضافية للتركيبة سوف تتكون من التتابعـــات التنظيميـــة

(البادىء أو المحفز ، الناهى ، المساعد ...الخ) وفى الكائنات الدقيقة يطلق على التتابعات بالانترونات introns وهى تقع داخل التتابع المشفر . لقد قدر (Kmalay and Goldberg ، ١٩٨٠) . ان نباتات الدخان بها ٦٠ ألف تركيب جينى متنوع بتراكيب مختلفة فى الجينوم لحوالى ٤٥٠٠ مليون أزواج القاعدة . التراكيب تمثل فقط ٤,٦% من الدنا الكلى فى جينوم الدخان . فى الكائنات الدنيئة العالية وجدت نسبة صغيرة نسبياً من الجينوم الكلى تستخدم فى تراكيب الجينات .

إذا قمنا بتعريف النباتات المتحولة وراثيا كواحد ذات جينات منقولة من أنواع مختلفة فأن النباتات المهندسة وراثيا لا تعنى أى جديد فى هذا المجال . لقد قام مربى النباتات على امتداد سنوات بتعديل نقل الجينات عبر الأنواع " الحواف borders " مع درجات مختلفة من النجاح . التريتيكال من أحد الأمثلة الواضحة فى هذا الشأن لأنها تحتوى على جينات ممنوحة لها أصلا من جنس القمح (Triticum) وغيرها من الجينات الأخرى من جنس الشوفان (Secale) . لقد تم إنتاج التريتيكال من خلال التعديلات التى أدخلها الإنسان حيث أنتج "دنا" DNA مندمج خصب وثابت وراثيا من أجناس أباء مختلفة . تحتوى نباتات التريتكال على جينات عديدة إجبارية من القمح وعدد من الجينات الإجبارية من الشوفان وعديد من الجينات الشائعة من كلا الجنسين . النباتات المهندسة وراثيا تتشابه فى كونها تحتوى على جينات نشأت من مصادر أبوية مختلفة ولكن الغالبية العظمى من الجينات تأتى من مصدر واحد وفى حالات قليلة قد يأتى جين من الآخر . إذا تصورنا أن متوسط التركيب الجينى سيكون قريبا من ١٠٠٠ قاعدة للدنا DNA وقمنا بنقل هذا المتوسط الجينى فى جينوم نبات الكتان الذى يملك أصغر جينوم لأى محصول حقلى كبير عند ٣٥٠ مليون زوج من القواعد نجد أن نسبة المعلومة الوراثية الغريبة صغيرة بشكل متزايد . إعتماداً على التعبير ووظيفة " الدنا " فان النباتات المهندسة وراثيا الناتجة تتصرف بشكل مختلف عن أبويها . يختلف نبات التريتكال من نبات الكتان المهندس وراثيا فى ان التريتكال به نسبة كبيرة من الدنا المندمج فى الجينوم أما الكتان المهندس وراثيا يحتوى على نسبة قليلة .

من بين الجينات التى عزلت وأدخلت فى النباتات والتى تؤثر على حماية النبات ما أحدثت تأثيرات عظمى على النباتات المتحولة وراثيا وفى رأى وقبول العامة . حيث أن الصفات الخاصة بمقاومة الأمراض ومبيدات الحشائش والآفات يمكن ملاحظتها بشكل درامى فى مجموع النباتات فأنها قد تحدث دورها من خلال تقنيات وراثية بسيطة . هذا يجعلنا نفكر فى أن واحد جين قد يمثل ١ : ٣٥٠٠٠٠ من الجينوم النباتى يمكن أن يحمى النبات من الجرعة القاتلة من مبيد الحشائش أو من الحشرات المفترسة . مع تطور تكنولوجيا النقل لإدخال الجينات المنقولة فى الخلايا الحية للعديد من أنواع المحاصيل

المختلفة ومع تكنولوجيا إعادة خلق النباتات الخصبة الكلية من الخلايا المحورة وراثيا ستكون عندنا القدرة لإنتاج نباتات ذات صفات جديدة . بالرغم من أن عدد الجينات المتاحة للنقل (المعزولة ، المنقاة ، المكلونة) تزداد بشكل درامى مازال هناك عدد قليل من هذه الجينات يملك صفات ذات قيمة زراعية . غالبية هذه الجينات تقع فى مجال وقاية النباتات .

المقاومة للأمراض النباتية

من أهم أهداف مربى النباتات تحقيق المقاومة للأمراض النباتية . التربية النباتية التقليدية نجحت بشكل منقطع النظير فى استخدام طرق التربية التقليدية لإنتاج أصناف ذات أنواع متباينة من المقاومة للأمراض ولكنها معركة لا تنتهى ومستمرة لأن المسببات المرضية تملك من الوسائل والتقنيات ما يمكنها من التغلب على المقاومة . من المشاكل التى تواجه العلماء المشتغلين فى الهندسة الوراثية لتحقيق المقاومة للأمراض أنه توجد تقنيات متعددة تستخدم بواسطة النباتات لتحقيق المقاومة . القليل من هذه التقنيات تم تحليلها بشكل كامل على المستوى الوراثى الجزيئى أو حتى على المستوى البيوكيميائى أو الفسيولوجى . لذلك فانه إذا لم تكن التقنية مفهومة جيداً على المستوى الوراثى الجزيئى فان استخداماتها فى الهندسة الوراثية تكون غير ذات قيمة من الناحية العملية . البحوث فى اتجاه تحقيق المقاومة للأمراض النباتية من خلال الهندسة الوراثية نجحت بشكل أكثر وافضل مع الأمراض الفيروسية . العديد من النباتات المهندسة وراثيا حورت لكى تعبر ببروتينات غطاء الفيروس زرعت فى تجارب حقلية وقد أعطت نتائج مبشرة . الفيروسات ذات جينوم متناهى فى الصغر يتكون تقليديا من قليل من الجينات فقط . من الجينات الشائعة ذلك الذى يشفر غطاء البروتين كى يغلف مادة الوراثة للحمض النووى للفيروس . العديد من البحاث وجدوا أنه إذا كان النبات ينتج بروتين مغلف يكون النبات مقاوم إذا لم يكن عنده مناعة كاملة للفيروس الذى تم اشتقاق البروتين المغلف منه (Powell وآخرون ، ١٩٨٦ ، Beachy وأخرون ، ١٩٩٠ ...) .

نتائج الاختبارات الحقلية الحقلية على خطوط النباتات المهندسة وراثيا لإنتاج النباتات ذات البروتين المغلف للفيروس كانت ناجحة بشكل ملفت للنظر حيث أظهرت نباتات هذه الخطوط أقل ضرر من جراء العدوى بالفيروس بينما دمرت نباتات المقارنة من الخطوط غير المتحولة وراثيا بالعدوى بالفيروس (Jongedijke وآخرون ، ١٩٩٢) . كما فى جدول (١٢-١) .

جدول (١٢-١) : الاختبارات الحقلية لأنواع المحاصيل المهندسة وراثيا وعلاقتها بوقايـــة المزروعات وسجلت في المراجع المنشورة .

Crop type	Primary transgene	Primary trait(s) measured in test	Sample units	Design Ra	Re	Sy[1]	Reference
Disease resistance:							
Tomato	TYMV cp	resistance to ToMV	rows	Y	4	1	Nelson et al. 1988
Tomato	TMV cp	resistance to ToMV	rows	Y	4	4	Sanders et al. 1992
Potato	PVX, PVY cp	resistance to PVX/Y	rows	Y	4	1	Kaniewski et al. 1990
Potato	PVX cp	resistance to PVX	rows	Y	4	3	Jongedijk et al. 1992
Cucumbe r	CMV cp	resistance to CMV	rows	Y	1	3	Gonsalves et al. 1992
Herbicide resistance							
Alfalfa	PAT	resistance to ppt	rows	?	1	1	D'Hallum et al. 1990
Sugarbeet	PAT	resistance to ppt	rows	?	9	1	D'Hallium et al. 1992
Tobacco	PAT	resistance to ppt	plots	?	2	1	DeGreef et al. 1989
Potato	PAT	resistance to ppt	plots	?	V	1	DeGreef et al. 1989
Linseed	mutant ALS	resistance to SUs	plots	Y	4	1	McHughen & Holm 1991
Insectresistance:							
Tomato	B.t.toxin	insect resistance	rows	?	?	3	Delannay et al. 1989
Other relevant tests:							
Linseed	npt-II	pollen dispersal	rows	N	1	2	McHughen et al. 1990
Cotton	B.t.toxin	pollen dispersal	rows	N	1	1	Umbeck et al. 1991
Potato	GUS	agronomic traits	plants	Y	3	1	Dale and McPartlan 1992
Canola	npt-II	agronomic traits	plants	N	1	1	Arnoldo et al. 1992
Linseed	mutant ALS	Agronomic traits	plots	Y	3	3	McHughen & Rowland 1991

Abbreviations: Ra, randomization; Re, replications; SY, station years (total of sites and times); TMV, tobacco mosaic virus, cp, coat protein; ToMV, tomato mosaic virus, PVX, potato virus X; PVY, potato virus Y; CMV, cucumber mosaic virus; PAT, phosphinothricin acetyl transterase; ppt, phosphinothricin; ALS, acetolactate synthase, SUs, sulphonylureas; npt-II, neomycin phosphotransterase; GUS, B glucuronidase; Y, yes; N, no; V, variable depending on genotype, treatment, location or year; ? unknown or not stated.

The most important aspects or the field test design include randomization (Ra), number of sites and years of an experiment, and the sample units, i.e. whether data were collected from single plants, rows of plants or complete plots.

المقاومة لمبيد الحشائش

المقاومة لمبيدات الحشائش الكيميائية قد تكون من أكثر الأمثلة دراميـــة لاستخدام الهندسة الوراثية فى النباتات حيث أن التأثير المرئى للنباتـــات المتحولـــة وراثيـــا الحيـــة والمزدهرة فيا بعد الموت فان النباتات غير المتحولة تناضل وتصبح فى حكم الذاكرة .

المقاومة للحشرات

الجينات العديدة المختلفة المسئولة عن المقاومة للأفات الحشـــرية خـــلال بحـــوث التحوير الوراثى قد طورت . من الواضح أن هذا الاقتراب فعال ولو أنه ضيق المجال فـــان وسيلة المكافحة الحيوية والمقاومة عبارة عن منتج بكتيرى بسيط والتـــى اســتخدمت فـــى المزارع منذ الخمسينيات . البكتريا باسيلليس ثورينجيسيز (Bt) تحمل جين تشفر الـــبروتين والتى عندما تهضم بواسطة الحشرات الحساسة يكون قاتلا . الطـــرز الوراثيـــة المختلفـــة للبكتريا تنتج صور مختلفة من البروتين السام . تؤثر على الأنواع المختلفة من الحشـــرات . السلالات الأكثر شيوعا فعالة ضد حشرات حرشفية الأجنحة بينما البعض الأخر فعال ضـــد حشرات ثنائية وغمدية الأجنحة .

تقييم استراتيجية التحول Evaluating the transformation strategy

لكي تستفيد الزراعة من التقدم فى تكنولوجيا نقل الجين فـــان الصفـــات المرغوبـــة تحتاج لإدخالها فى الأصناف التجارية لإثبات فاعليتها وعدم إحداثها لأيـــة أضـــرار علـــى الصفات الزراعية للصنف . لذلك فان خط النباتات المحولة وراثيا لابد أن يثبت كفاءته مـــن خلال بطارية من الاختبارات تبدأ فى المعمل وتستمر فى التجارب الحقلية على المســـتوى الكبير . الاختبار المحدد يجرى من منطلق الإنتاج التجارى . فى العادة فان الفريق البحثـــى يتبع تجارب التحويل مع اختبارات وطرق مختلفة . بمجرد تعرض الخلايا النباتيـــة لنـــاقل "الدنا" الغريب سواء كانت أجروباكتيريوم أو القذائف الدقيقة فأنها يجب أن تحلـــل لتقريـــر نجاح النقل . هذا يتضمن الانتخاب للتخلص من (فى الناحية العملية لتقليل) الخلايا غـــير المتحولة وبحث تكامل الجين الغريب فى جينوم العائل الجديد وثبات تكامل "الدنا" فى جينوم العائل ، ودرجة التعبير عن الجينات المنقولة . بالإضافة الى ذلك فان الباحثين عليهم تنشيط الخلايا المتحولة كى تنمو وتتجدد كنبات كامل . فى العديد من الأنواع النباتية فـــان النقـــل الفعلى "لدنا" خلايا النبات العائل يستمر بشكل متقدم نسبيا ومن ثم فان الخلايا المتحولة والتى يجدد منها النبات أصبحت ميسرة وممكن تحقيقها . الحبوب والبقوليات تقع فى هذه المرتبـــة حيث "الدنا" يمكن نقله بنجاح بواسطة القذف الدقيق microprojectile (مـــع محـــاصيل الحبوب مثل الذرة والقمح) أو الاجروباكتيريوم (مثل البقوليات كالعدس) . ليكن معلومـــا

أن التجديد والخلق الناجح من الخلايا المتحولة لهذين المجموعتين الهامتين للأنواع المحصولية قليل .

معظم استراتيجيات التحول تستخدم الأنسجة المتجددة فى الخارج in vitro للتغلب على هذه المحدودية . الأنواع المحصولية الكبرى جميعا ذات طريقة تجديد من خلال زراعة الأنسجة ولو أن البعض يكون أكثر كفاءة من الأخرى . النسيج المتجدد يتعرض لناقل التحول ثم تنشط الخلايا المتحولة فرديا داخل النسيج حتى تتجدد أى تنمو فى النباتات الكلية . فى أى نسيج فان عدد من الخلايا سوف تصبح متحولة بشكل فعلى . مرة أخرى واعتماداً على كفاءة نظام التحول والطرز الوراثى فان عدد الخلايا المتحولة قد يكون عاليا (باستخدام الأجروباكتيريوم فى نسيج الدخان) أو قليلة نسبيا (الاجروباكتيريوم فى العدس). الصعوبات فى خلق النباتات المتحولة وراثيا تتمثل فى تعريف وتجزىء الخلايا المتحولة من الخلايا غير المتحولة فى كتلة النسيج وكذلك مساعدة وتنشيط الخلايا المتحولة كى يعاد تخليقها ونموها فى النباتات الكلية .

الاختبارات المعملية

فى التجارب الأولية لإنتاج النباتات المتحولة وراثيا يحاول الباحثون نقل مجموعة من جينات عديدة تتكون من جين معلم يمكن قياس Scorable marker gene أو جين معلم انتخابى Selectable وربما جين ذات قيمة زراعية عالية . فى أكثر الجينات العلامة المقاسة B-glucuronidase ويطلق عليه "GUS" . عند التعبير فى النسيج النباتى فان GUS يتفاعل مع وسيطه فى التحليل النسيجى الكيميائى لإنتاج صبغة داخلية فى الخلية المتحولة . يقوم الباحثين باستخدام اختبار GUS للحكم على كفاءة التحول الخلوى والتعبير. فى الناحية العملية فان جزء من النسيج الذى زرع خارجيا يتم تشريحه لتقدير الكفاءة النسبية للطريقة المستخدمة لنقل الجينات . التقييم ليس محدد لأنه فى بعض أنسجة النباتات تنتج الصبغة الزرقاء طبيعيا مما يعطى نتائج موجبة مزيفة غير حقيقية . كذلك فان النتائج الموجبة المزيفة قد تحدث إذا استخدمت الأجروباكتيريوم كناقل وآلية تخليق البروتين البكتيرى التى تعبر عن الجين بينما هى موجودة فى البكتريا . لكى نتغلب على هذه المشكلة قام البحاث بتقديم الانترون النباتى فى GUS المشفر للتتابع . آلية تخليق البروتين النباتى يمكن أن تعمل فى وجود الانترون ولكن النظام البكتيرى لا يستطيع (Vancanneyt وأخرون ، ١٩٩٠) .

من أكثر العلامات الجينية المختارة هو النيومايسين فوسفوروترانسفيريز النوع II (npt-II) التى تشفر للانزيم الذى يكسر ويفقد سمية المضادات الحيوية من

الأمينوجليكوسيدات فى قسم النيومايسين مثل الكانامیسین . عندما يضاف الكاناميسين الى المزرعة التى يكون نمو النسيج المتحول وهميا فان الكاناميسين يفترض أن يقتل الخلايا العادية غير المتحولة أما الخلايا المتحولة يمكن أن تكسر المضاد الحيوى ومن ثم تستمر فى النمو . لذلك يعتبر الكاناميسين عام انتخاب لأنه يمكن أن يستخدم فى انتخاب الخلايا المتحولة على عكس ما يحدث مع العلامات الممكن قياسها Scorable (مثل GUS) والتى لا تعطى ميزة نمو الخلايا المتحولة . من الناحية العملية تكون العلامات الانتخابية غير فعالة . فى العادة فان بعض الخلايا تكون قادرة على البقاء وحتى النضال على عامل الانتخاب ولكنها تعود مرة أخرى الى الحالة غير المتحولة . لذلك فان الخلايا المتحولة الوهمية فى خطوط الخلايا والنباتات معاودة الخلق المشتقة منها يجب أن تتفحص خلال العملية على الأقل حتى يختبر نسل البذور .

الجين محل الاهتمام قد يستخدم أحيانا كعلامة أو معلم انتخابى إذا كان ناتج الجين (البروتين المشفر بواسطة الجين) مسئول عن تحقيق ميزة انتخابية للخلايا المتحولة . من الأمثلة فى هذا المقام جين PAT الذي يميل الى تحقيق المقاومة لمبيد الحشائش فوسفينوثريسين . يبدو أن هذا الجين يعمل بكفاءة وفاعلية فى الخلايا بنفس القدر كما فى النباتات الكاملة لذلك فان الفوسفينوثريسين يمكن أن يضاف الى المزرعة لتحقيق ميزة انتخابية لهذه الخلايا التى تحولت بنجاح مع الجين . إن استخدام الجين الذى يعطى ميزة من صفات زراعية مرغوبة كعامل انتخابى من خلال طريقان . الطريق الأول كما ذكر سابقا أن " الدنا DNA " المتحول يغرس كشريط لذلك فان وجوده فى خلية متحولة لجين واحد على الشريط (مثل npt-II) توضح وجود جين آخر على نفس الشريط (يقال أن الجين محل الاهتمام) . فى الناحية العملية لا يحدث هذا الوضع دائما . فى بعض الأحيان توجد أخطاء فى تكامل الدنا الغريب ولذلك فان الجين العلامة يجب أن يتكامل بنجاح بينما الجين محل الاهتمام لا ينجح . إن استخدم الجين محل الاهتمام كعلامة يحد ويقلل من هذه المشكلة. الطريق الثانى يتمثل فى أن التخلص من الجين ذات الصفات الزراعية غير الضرورية مثل npt-II من الشريط المحتوى على PAT يسهل عملية إنتاج النباتات المهندسة وراثيا والنسل الخاص بها المشتق من الصنف خلال عملية التنظيم وقد أدى ذلك الى بروز اهتمام مؤداه أن npt-II فى البيئة قد يحمل بعض المخاطر ولو أن الدلائل عن هذا الوضع غير متوفرة بما فيه الكفاية .

من الاختبارات الأخرى التى صممت لتحقيق تكامل " الدنا " المنقول ما تشمل اختبار ساوثرن "Southern blot" على اسم الباحث الذى طور الطريقة . فى الطريقة القياسية لساوثرن يتم التعليم الاشعاعى لشريحة " دنا " (مسبار Probe) المقابلة لتتابع معروف

لشريط الدنا المنقول وبعدئذ يسمح له بالتداخل مع الدنا الجينومي من خطوط الخلايا أو النباتات المتحولة وراثيا . إذا تم إدخال الدنا المنقول المتحول في جينوم الخلية فان المجس أو المسبار المعلم إشعاعيا سوف يتكامل ويرتبط بالتتابع المتحول ويمكن أن يكشف عنه بالقياس الاشعاعي . مجس " الدنا " غير المرتبط يغسل بعيداً . اختبار ساوثرن وسيلة شديدة القوة لتقدير وجود التتابع المعروف ولكنها غير دقيقة حيث نشر إمكانية الحصول على نتائج موجبة مزيفة من هذا الاختبار . بالرغم من أن هذه ترجع في الغالب الى تلوث الدنا من الناقل وهذه المشكلة يمكن التغلب عليها بإجراء تحوير بسيط في الطريق حيث أن طريقة ساوثرن مازالت محدودة في تقدير وجود الجين فقط . الطريقة لا تشير الى أى معلومة خاصة بنشاط الجين أو التعبير الجيني . إختبار ساوثرن يشابه الاختبار المعول ولكنه يقدم وسيلة للتعبير الجيني حيث يجرى الاختبار للكشف عن وجود mRNA . الاختبار ويسترن يصلح في وجود البروتين الجيني نفسه وهو اختبار أفضل يعبر عن نشاط الجين المتحول .

في السنوات الحديثة طورت طريقة سهلة لاختبار وجود الدنا المحور باستخدام تفاعل سلسلة البوليميريز (PCR) والذى يكبر شرائح " الدنا " بشكل متخصص وسريع . إذا كانت عينة صغيرة من النسيج تحتوى على الدنا الغريب فان تفاعل PCR بسيط طول الليل سوف يخلق نسخ كافية من التتابع يمكن الكشف عنه بسرعة وتعطى السجل موجب . لاتقدم أى من هذه الاختبارات معلومات عن الجينات المتحولة . في بداية حقبة الهندسة الوراثية النباتية كان هناك اهتمام حول ثبات الدنا المتحول . لقد أوضحت التقارير أن الدنا الجديد سوف يتجه لإعادة الترتيب خلال أو بعد التكامل في جينوم العائل الجديد ومن ثم فان عدم الثبات هذا يربك وقد يعيق إذا حدثت إيقاف فجائي للنباتات المتحولة وراثيا في التعبير عن خصائصها الجديدة . بسبب أننا لم نفهم حتى الآن بشكل دقيق أين يجب إدخال أو زرع الدنا المتحول المنقول في جينوم العائل (بخلاف الموقع الذى يبدو أنه عشوائى) فانه يصعب التنبؤ وتحديد عدم الثبات هذا . لكى نتغلب على هذا الوضع فان معظم النباتات الجديدة المتحولة وراثيا تترك حتى تتكون البذور وإجراء التحليل المناسب (مثل تعرض النباتات المقاومة لمبيد الحشائش الى المبيد) على النسل . تبنى هذه الاستراتيجية على فرضية أن الدنا المنقولة تبقى ثابتة خلال الانقسام الميوزى وهذا يحدث بسبب ثباتها وتكاملها مع جينوم العائل .

الاختبارات البيئية المتحكم فيها Controlled environment tests

تحليل خطوط النباتات المهندسة وراثيا في الصوب الزجاجية وحجرات النمو هي مصدر معظم البيانات التى توفرت لدينا عن أداء هذه الخطوط النباتية . في هذه المرحلة يتم تقدير نظم الانعزال لمقارنة الجينات المنقولة مع قوانين مندل العادية . في البداية يتم اختبار

النباتات من حيث كفاءة الصفات الجديدة والمطلوبة فى ذلك الوقت . النباتات الجديدة الأولية تميل الى عدم رشها بمبيد الحشائش والتى يفترض أنها مقاومة له مثال ذلك أن أى خطأ فى الرش قد يقتل النبات الواحد الذى سوف يشتق منه الصنف الجديد . كذلك فان الناتج الأولى سوف يكون ناقص التجانس hemizygous للجين (أى ليس فيها موقع مقارن على الكروموسومات المتجانسة : كروموسوم واحد قد يكون فيه الدنا المنقولة بينما المتجانس لايملكها) ومن ثم فان استجابة الناتج الابتدائى من النباتات سوف تختلف من النسل المتجانس للعبور الذاتى . فى النهاية فان نتائج اختبار واحد على نبات واحد يقدم معلومات قليلة الفائدة . استمرارا لمثال النبات المقاوم لمبيد الحشائش فان استخدام مبيد الحشائش على النباتات المتحولة سوف يزودنا بمعلومة ما إذا كانت هذه النباتات الناتجة سوف تستمر فى الحياة أو سوف تعطينا بعض الدلالات عن درجات الضرر .

مع النسل الناتج يمكن بل يجب إجراء اختبارات المكررات مع خطوط الإنتاج المتجانسة (التى تكون عبارة عن الكلونات فى حالة النباتات ذاتية التلقيح) باستخدام معدلات متعددة من مبيد الحشائش لتحديد كم من الخطوط المتحولة المقاومة تزيد أو تفوق الصنف الأصلى الأبوى غير المتحول وراثيا . على نفس المنوال فان خط النباتات المتحولة المقاومة للمرض يمكن إجراء العدوى له تحت ظروف متحكم فيها لقياس الاستجابة الكمية للنباتات بالمقارنة بنباتات المقارنة . بالإضافة الى المقدرة على تقدير النشاط الفينولوجى للجينات المنقولة فان اختبارات البيئة المسيطر عليها يمكن أن تعطى دليل عن الصحة العامة لخط الإنتاج المهندس وراثيا . بعض النباتات المتحولة تكتسب صفات مدمرة فى عملية التحول . إذا حدث غرس للدنا المنقول كمثال فى الجين الداخلى النشط فان هذا الجين يفقد نشاطه كما أن النسل المتجانس سوف يملك الطراز الوراثى المتنحى للجين الأصلى على الموقع . اعتمادا على طبيعة الجين فان النبات قد يكون أقل لياقة عما هو الحال مع الأقارب غير المتحولة وإذا كان يمثل جين محدد فان النبات قد يكون غير خصب أو بدون حيوية . هذه المشكلة على ما يبدو غير شائعة الحدوث (McH ughen and Rowland ، ١٩٩١) .

من الأسباب الأخرى لقلة لياقة النباتات المهندسة وراثيا وجود تباينات للكلونة الجسمية فى الخارج in vitro . هذه الظاهرة غير الشائعة يحتمل أن تكون خارج السيطرة. التباينات الجسمية الكلونية ضارة بشكل سائد ولو أن بعض الأنواع النافعة خلقت عن هذا الطريق . التباينات الجسمية المكلونة يمكن أن تقلل أو تحد من خلال تقييد فترة الخلل فى نمو الخلايا فى الخارج بقدر الإمكان ولكن من الصعوبة إن لم يكن مستحيلا التخلص منها تماما . يمكن ان تستخدم التربية التقليدية كذلك إذا أمكن حدوث خط نباتات متحولة جيدة بواسطة التباينات الجسمية الكولونية وهنا قد يحدث عبور رجعى فى الخط النباتات المتحولة

بشكل بسيط الى الأب الجيد الصفات مع انتخاب النسل المبنى على الصفة المنقولة وضد الصفة الخاصة بالضرر .

اختبار البيئة المتحكم فيها يمكن أن يستخدم لانتخاب معظم الخطوط المبشرة وأخذها الى المستوى الحقلى . إذا كان جيل النباتات المتحولة بسيط نسبيا كما هو الحال مع أنواع عائلة Solanaceous (الدخان ، البتونيا ، البطاطس) يصبح من الأهمية اختيار أو استبعاد الخطوط الفقيرة الصفات قبل الانتقال الى مرحلة التجريب الحقلى . مع أى مادة وراثية يجب ألا نضيع الوقت والجهد والأرض على خطوط أصناف نباتية قد لا تعطينا أية بيانات عن الإنتاجية حيث ان تقنيته تمكن من تعريف فقر الأداء قبل الذهاب للتجارب الحقلية مفيدة وواجبة الاعتبار . بعض الصفات الوراثية المنقولة لا يسهل قياسها فى المعمل أو حجرات النمو أو الصوبة الزجاجية (مثل مقاومة النبات المهندسة وراثيا لمبيدات الحشائش من مجموعة السلفونيل . بسبب أن هذه المبيدات القوية (مثل ميتسلفيورون) تستخدم بمعدلات منخفضة جدا (٤,٥ جم / هكتار) يكون من المستحيل استخدام المبيد بتجانس على كل الأفراد فى الأصيص أو فى المراقد تحت الظروف البيئية المسيطر عليها. بينما يمكن استخدام مختلف الاختبارات المعملية لتقدير وجود والمستوى النسبى للتعبير عن الجينات المنقولة فان درجة المقاومة المسئولة تتطلب اختبارات حقلية على المستوى الحقلى الواسع لكى نستبعد عدم تجانس التطبيق لمبيد الحشائش .

بعض الصفات ربما تظهر بصورة أفضل فى البيئات المتحكم فيها على عكس ما يحدث فى التجارب الحقلية . من أمثلة هذا الوضع خطوط النباتات المتحولة المقاومة للحشرات . مجموع الحشرات المفترسة والتلف الذى تحدثه للنبات يسهل قياسه فى البيئات تحت السيطرة عما هو الحال فى الحقل حيث يمكن أن تتنافس الأنواع المختلفة مع بعضها سواء على النبات أو على الآفة مما يضيف مقياس للاختلافات والتباينات يسهل السيطرة عليها فى الداخل . عندما يكون الهدف إنتاج صنف نباتى محسن وراثيا على مستوى واسع يجب إجراء اختبارات كافية لتقدير ملاءمته للتسويق التجارى بشكل كامل ومتكامل . بالرغم من أن الاختبارات الأولية التى تجرى فى المعمل أو الصوب أو حجرات النمو مفيدة فى التخلص واستبعاد الخطوط غير الجيدة الصفات من البداية كما أنها قد تعطى مؤشرات عن الخطوط المبشرة إلا أن الخطوط التى تختار يجب ان تختبر فى الحقول المفتوحة تحت ظروف الإنتاج الفعلية حتى لا تحدث خسارة فى الاستجابة .

الاختبارات الحقلية

بصرف النظر عن الصفة أو نظام التقييم الأولى فان خطوط إنتاج النباتات المتحولة يجب أن تجرى تحت الظروف السائدة فى الإنتاج التجارى . تجدر التذكرة بان التقييم الخاص بالقدرة التسويقية التجارية لخط الإنتاج المستهدف يكون دقيق وحقيقى إذا أجرى تحت ظروف إنتاج الصنف نفسه . لقد بدأت خطوات إجراء اختبارات حقلية على النباتات المتحولة وراثيا فى السنوات الأخيرة فقط . والآن يتم الاختبار بعدد مئات كل سنة ومازال هناك نقص كبير فى البيانات والتقارير الواردة من هذه الاختبارات . الجدول (١٢-١) يعطى معلومات عن الاختبارات التى أجريت والنتائج التى اشتقت منها حتى الآن . الأسباب عن قلة عدد التجارب الحقلية التى أجريت وقلة البيانات متعددة ومتباينة . السبب الأول يتمثل فى انه قبل اتخاذ قرار الاختبارات الحقلية تكون هناك حاجة للحصول على بيانات كافية عن طبيعة خط إنتاج النباتات المتحولة من خلال التقييم المعملى وتحت الظروف المسيطر عليها (صوبة أو حجرة نمو) لأنه لا يوجد ما يجبر الباحث على إجراء التجارب الحقلية إذا لم يكن متأكدا تمام التأكيد من أن الجين المنقول سوف يعبر عنه . السبب الثانى أن التجربة الحقلية المناسبة تتطلب مدد من التقاوى . التكنولوجيا لنقل وإنتاج الأنواع المحصولية طورت حديثا وهى فى العادة تأخذ أجيالا عديدة لزيادة التقاوى من النبات المتحول الأصلى بما يمكن من الحصول على بذور تكفى لإجراء التجارب الحقلية . السبب الثالث أن العديد من البحاث يشعرون بعدم الحاجة للانتقال للتجارب الحقلية حتى يبدأوا بإنتاج خط إنتاج من الصنف التجارى للمحصول محل الاهتمام . لقد تم تطوير العديد من طرق التحويل الوراثى لأصناف منمذجة داخل النوع وهى تأخذ وقتا لتحوير الطريقة بما يتلاءم مع الأصناف التجارية أو كى تستخدم التربية التقليدية لنقل الصفة الجديدة من الصنف القياسى الى الصنف التجارى . على نفس المنوال فان معظم تجارب التحول المبكرة تستخدم الجينات العلامات لمتابعة وتطوير عملية التحويل لنوع معين ويشعر معظم الباحثين بعدم الحاجة للانتقال لإجراء التجارب الحقلية على خطوط متحولة وراثيا تحتوى على جين جديد بدون قيمة زراعية . النباتات المتحولة وراثيا تحمل جينات علامات ذات ميزة جيدة فى التجارب الحقلية ومن أمثلة ذلك تقدير درجة حدوث الهروب خلال العبور الوراثى (Ncughen وآخرون ، ١٩٩٠) . النباتات المهندسة وراثيا التى تحمل جينات ذات قيمة زراعية جيدة قد تدخل فى الاستخدامات ومثال ذلك القطن الذى يعبر فيه ببكتريا أو توكسين بكتريا الباسيلليس لتعقب انتشار حبوب اللقاح بواسطة الحشرات (Umbeck وآخرون ، ١٩٩١) .

بالإضافة الى ذلك وجدت أسباب أكثر من الناحية العملية تجيب عن التساؤل الخاص بقلة إجراء التجارب الحقلية . العديد من البحاث يجرون دراسات علـــى التحـــول النبـــاتى خاصة هؤلاء الذين يعملون فى الجامعات ومعامل البحوث الحكومية والذين يعـــانون مـــن نقص الإمكانيات الحقلية لزراعة مادة محولة وراثيا للاختبار و/أو نقص الخبراء القـــادرون على تصميم وتحليل النتائج التى يتحصل عليها من الاختبارات الحقلية . المزرعة البحثيـــة حتى ولو كانت صغيرة مكلفة للغاية وتتطلب إمكانيات ذات قيمة . فى النهاية فـــان القيـــود التشريعية حدت بشكل كبير من عدد الاختبارات الحقلية التى تجرى . حكومات معظم الدول التى عندها إمكانيات وكفاءات لإنتاج نباتات متحولة وراثيا عندها تشريعات تتحكم فى النشر البيئى للمادة المهندسة وراثيا والعديد من هذه الدول عندها قوانين تمنع تعريض البيئة لمثـــل هذه النباتات والكائنات الحية المهندسة وراثيا كذلك . فى السنوات الأخيرة أصبحـــت هـــذه التشريعات أقل صرامة فى معظم الدول .

تصميم التجارب الحقلية Field test design

فى العادة يبرز سؤالان يجب الإجابة عليهما عند تحليل واتخاذ قرار الإنتاج التجارى لخطوط النباتات المهندسة وراثيا . الأول يتمثل وبوضوح عما إذا كان الخط الجديد ســـيعبر أم لا عن الصفة الجديدة للدرجة التى سوف تحقق منفعة للمنتج أى المزارع . لذلك فان خط النباتات المتحولة يجب وفى الواقع أن تحول وتعبر عن الجين الجديد لحد ما ولكن ليس بمـــا فيه الكفاية لتحقيق فائدة حقيقية . مثال ذلك الكتان المتحول المقاوم لمبيد الحشائش جليفوسات كان قادرا على تحمل استخدام المبيد الحشائشى فى التجارب الحقلية أمـــا النباتـــات غـــير المتحولة ماتت ولكن مبيد الحشائش أحدث تلف وضرر أدى الى تأخير النضج لأيام عديـــدة مما جعل من خطوط النباتات المتحولة وراثيا غـــير ذات قيمـــة مـــن الناحيـــة التجاريـــة (McHughen and Mitchel، ١٩٩٠) . لذلك فانه بالرغم مـــن أن النباتـــات تســـتطيع العيش مع جرعة قاتلة عادية من مبيد الحشائش فان خطوط النبات المتحولة وراثيـــا غـــير حيوية من الناحية التجارية . السؤال الثانى ذات الاهتمام يتمثل فـــى الوظـــائف الزراعيـــة العادية لخطوط الإنتاج النباتية المتحولة وراثيا . بالرغم من التأكد من أن الخـــط المتحـــول الجديد سوف يعبر عن صفة جديدة فانه من الصعب التأكد من أنه ســـيعدل مـــن الصفـــات الزراعية الأخرى التى يتوقع وجودها فى الصنف التجارى .

قياس نشاط الصفة الجديدة

التكرارية والعشوائية من الأمور ذات الحرجة فى وضع مصداقية النباتات المتحصل عليها من الاختبار حيث أنها تهذب وبهدوء التباينات البيئية التى قد تؤثر على النتائج . مثال

ذلك أنه لا يوجد حقل واحد متجانس في صفات التربة . إذا كان جانب واحد من الحقل أكثر خصوبة فان النباتات النامية هناك ستكون أفضل ليس بسبب أية مميزات وراثية ولكن بسبب ظروف التربة . هذا التأثير قد لا يميز فى التجارب بغير تكرارات أو فى التجارب غير العشوائية . لقد استخدمت أنواع عديدة من تصميم التجارب الحقلية للحصول على بيانات ذات معنى إحصائيا . الاختبار المبكر للكشف عن مقاومة نبات الدخان لمبيدات الحشائش (DeGreef وآخرون ، ١٩٨٩) . استخدم تصميم يسمى التصميم العواملى ٣ × ٤ "Factorial" . فى هذا التصميم تم اختبار ثلاثة طرز وراثية (واحد يمثل الصنف الأبوى غير المتحول واثنان من الخطوط المهندسة وراثيا) فى أربعة معاملات من مبيد الحشائش (بدون وثلاثة تركيزات متزايدة من المبيد الكيميائى) . الصفة الهامة كانت تتمثل فى استخدام قطع تجريبية كوحدة قياس . ما هو سائد من نباتات أو خطوط فردية . القطع التجريبية استخدمت كذلك فى اختبار نباتات الكتان المتحولة وراثيا لتقاوم مبيد الحشائش (MGH ughen & Holm ، ١٩٩١) . فى هذه الحالة يطلق على التصميم الحقلى بالقطعة التجريبية المجزأة "Split – Plot" والتى تسمح بمقارنة أكر من متغير واحد . فى هذه الحالة فان المتغير الأكبر كان نوع مبيد الحشائش (يدون مبيد للمقارنة بالإضافة الى نوعين مختلفين من الكيميائيات ذات نفس طريقة الفعل) بينما المتغير الأصغر كان الطرز الوراثى (صنف أبوى غير محور وراثيا للمقارنة وجينات خطى إنتاج محور وراثيا مشتق من صنف المقاومة) . بالإضافة الى وجود واتباع القطع التجريبية فان هذا الاختبار يجرى بشكل عشوائى للمعاملات ويكرر أربعة مكررات .

قياس الصفات الزراعية

النجاح التجارى للصنف النباتى الجديد سواء كان مهندس وراثيا أو تقليدى يعتمد على الأداء الشامل للطراز الوراثى . لن يكون عند الفلاحين أية اهتمامات أو حماس لأى صنف نباتى جديد إذا كانت الإنتاجية منخفضة بشكل معنوى ومثال ذلك أصناف نباتية كثيرة حتى لو كانت تقدم إسهامات كبيرة إضافية ومفيدة للفلاح . كما ذكر قبلا أنه يمكن استخدام اختبارات المعمل والظروف البيئية المتحكم فيها لتحديد ما إذا كانت عملية التحول أحدثت تأثيرات ضارة درامية (مثل عدم الخصوبة وعدم الحيوية) فان الاختبارات الحقلية الموسعة تعتبر الطريقة الوحيدة لاكتشاف ما إذا كانت التأثيرات الضارة الموجودة أقل وضوحا .

معظم الصفات النوعية (مثل لون الأزهار ، سمات النمو) يمكن أن تسجل فى الاختبارات المبكرة باستخدام النباتات الفردية أو الخطوط . لكى نقدر أداء الصفات الكمية خاصة المحصول (مثل محصول البذور أو الكتلة الحيوية اعتمادا على نوع المحصول) تحتاج لإجراء تجارب موسعة فى قطع تجريبية تعتبر وحدة قياس . المحصول يكون وظيفة

القطعة التجريبية والمجاميع . أداء محصول نبات مفرد لا يعتبر دليل عقلانى لأداء مجموع النباتات المشتقة من فرد واحد . المساحات التجريبية تقدم فقط تقدير دقيق ومعقول للمحصول . هذا يفسر لماذا أن القطع التجريبية هامة وحرجة جدا فى قياس المحصول ولماذا بيانات المحصول ناقصة فى معظم تجارب الحقل المنشورة حتى الآن حيث النباتات أو الخطوط الخطية استخدمت كوحدة من وحدات القياس والتقييم .

من النواحى الحرجة التى ينظر إليها باهتمام زائد مصدر التقاوى للتجارب الحقلية خاصة فى الاختبارات المبكرة للجيل الأول لخطوط النباتات المحورة وراثيا . بسبب أن خطوط الاختبار تعتبر ذات قيمة وزيادة إنتاج البذور تعتبر من متطلبات إجراء التجارب الحقلية ولذلك فان التقاوى الخاصة بالنباتات المهندسة وراثيا تربى للتأكد من صحة النباتات والبذور الناتجة . هذا بالرغم من أن بذور المقارنة (الصنف الأبوى غير المحور وراثيا) متوفرة من مخزون التقاوى الأصلية والتى خزنت لسنوات عديدة والتى منها أخذت الآباء المحورة وراثيا أو تكون التقاوى متوفرة من مخزون البذور وفى هذه الحالة لا يوجد ضمان لظروف النمو . من الأهمية التأكيد على الاختلافات فى الأداء بين خطوط النباتات المتحولة وراثيا ونباتات المقارنة والتى لا ترجع الى اختلافات فى نوعية التقاوى المزروعة.

البيانات من التجارب الحقلية التى صممت إجباريا لتقدير الأداء الزراعى لخطوط النباتات المهندسة وراثيا (المقابلة لتلك التى صممت أوليا لقياس كفاءة الصفة الجديدة) بدأت تظهر فى المراجع . من أول هذه البيانات تلك التى قارنت الأداء الزراعى لخمسة خطوط كتان متحولة وراثيا ضد أربعة أصناف تجارية كبرى وكذلك ضد ٢٤ صنف مقابل مربى بالطريقة التقليدية (تلك التى تعرضت للتحليل لتحديد ملاءمتها للتسجيل) . تصميم التجارب كان قطع كاملة العشوائية مع ثلاثة مكررات . بالإضافة الى ذلك أجرى هذا الاختبار فى نفس الوقت مع أو عند ثلاثة مواقع منفصلة مما يساعد فى الحكم على تأثير الموقع . المعايير التى تقاس فى هذا الاختبار تشمل عدد الأيام حتى تتفتح الأزهار anthesis والفترة حتى النضج النسبى ، الارتفاع ، التفريع ، إنتاج التقاوى ، وزن البذور ، محتوى الزيت وجودة الزيت وهى الصفات الراعية الكبرى (والجودة) ذات الأهمية التجارية . فى هذا الاختبار الخاص أظهرت خمسة خطوط للنباتات المهندسة وراثيا أداء أفضل من الأصناف القياسية بينما كان صنف واحد دون المستوى (ومن ثم لم ينقل لمرحلة الاختبارات التالية) . أوضحت النتائج أن التحول نفسه لا يكون متداخلا بالضرورة مع الإنتاجية العادية للنباتات ولكن يجب إجراء تجارب حقلية على مستوى كبير لغربلة الخطوط المهندسة وراثيا غير الجيدة الصفات .

لقد أجرى نوع آخر من التجارب الحقلية باستخدام نباتات الكانولا المتحولة وراثيا . لقد تم تحويل ١١ خط من نباتات الكانولا كي تحتوى على الجين العلامة npt II المسئول عن المقاومة للكاناميسين (Arnoldo وآخرون ، ١٩٩٢) . هذا الجين ليس له قيمة زراعية ولذلك كان الهدف من الاختبار تحديد تأثير التحول على الصفات الزراعية . لقد تم تسجيل النضج وإنتاج البذور ومحتوى الزيت والبروتين . أوجه التشابه بين كل خط إنتاج للنباتات المهندسة وراثيا وأبويها . بالرغم من أن النتائج قد أوضحت الطبيعة المعتدلة لعملية التحول وناتج جين npt II فقد لوحظ أن البحاث لم يسجلوا ما إذا كان الأختبار صمم بطريقة عشوائية أو بمكررات . من الأهمية أن نذكر أن الأهداف العلمية المشتركة في تكنولوجيا الهندسة الوراثية غالبا ما تتوجه ناحية تطور الصنف النباتى تجاريا فى البيئة . فى بعض الأحيان تختلف الأهداف التقنية للاختبار عن الأهداف التجارية . بينما يكون عندنا اهتمام باستخدام تكنولوجيا الهندسة الوراثية للتحسين المحصولى فان الأسئلة المثارة تعكس الاهتمام الشخصي للشخص المهتم والملاحظ للتجربة . مثال ذلك البحاث المشتركون في عملية التحول أكثر اهتماما فيما كيف أن خط النباتات المهندسة وراثيا سيظهر أداء نسبى بالنسبة للصنف الأبوى . الفلاح من جهة أخرى أكثر اهتماما من ناحية أن خط إنتاج النباتات المهندسة وراثيا سيظهر أداء نسبى للصنف الجارى زراعته والذى يحقق له عائدات مجزية . التربية النباتية التقليدية ناجحة جدا فى إحداث تحسينات متزايدة للأصناف النباتية ومن ثم قد تكون فترة نصف الحياة للصنف من الناحية التجارية قصير جدا . لذلك فانه إذا أمكن تحسين الصنف الأفضل خلال عملية التحول فى توقيت الاستعداد لظهور الصنف ونشره تجاريا وحيث يمكن استبعاد الصنف الأبوى الأساسى . الصنف المهندس وراثيا الجديد يجب أن يتنافس مع غيرها من الأصناف الموجودة فى السوق والتى قد تكون محسنة كذلك ولو أنها مختلفة حتى تحتل مكانة فى السوق .

إنتاج وتقييم المحاصيل المهندسة وراثيا فى برامج التربية :

الشكل (١٢-١) يمثل الخطوات الأساسية المطلوبة للحصول على صنف كتان مهندس وراثيا . المحاصيل الأخرى خاصة تلك التى ليس لها تلقيح ذاتى قد تتطلب بعض التحويرات عن هذا البروتوكول . بالضرورة توجد عشرة نواحي كما يلى :

١-يتم خلق وتجديد ساق مهندس وراثيا من النسيج المتحول . الساق يستأصل من المصدر وتزال حلقة الساق كى تستخدم فى الاختبارات البيوكيميائية والجزيئية للتحول مثل PCR و GUS . الساق ينمى له جذور ويشجع نمو الساق كذلك .

٢-إذا فرض أن تقييم حلقة الساق أعطى نتائج موجبة يعتبر الساق مهندس وراثيا . بعد تكوين الجذور بشكل فعال يتم نقل النبات الصغير الى التربة تحت ظروف

بيئية متحكم فيها . هذا النبت الأولى يسمح له بالنمو والنضج وإنتاج البذور تحت ظروف بيئية نموذجية لتعظيم إنتاج التقاوى . إذا كانت نتيجة الاختبار على شريحة الساق سالبة للتحول يتم استبعاد الساق .

٣-التقاوى الناتجة من الذرية للنباتات المهندسة وراثيا تقسم الى ثلاثة مجموعات . يفضل أن تكون المجموعة من ٢٠ بذرة على الأقل ١٠ بذور تزرع بشكل مستقل لزيادة كميات البذور . المجموعة الثانية من البذور تنمى والبادرات تستخدم فى الاختبارات البيوكيميائية والجزيئية للتأكيد على ثبات ووراثية النباتات المحورة للخطوط الإنتاجية . المجموعة الثالثة تترك وتحفز للاحتياط .

٤-إذا أظهرت الاختبارات على المجموعة الثانية تأكيد الانعزال الوراثى تبعا لقانون مندل للموقع المفرد الذى أدخل فان المجموعة الأولى تنمى وكل نبات يختبر لتأكيد ومعرفة إمكانيات التعبير عن الجين المنقول . يفضل ٢٠ ولكن على الأقل عشرة نباتات تنمى فى خط من عشرة أنسال على الأقل . إذا كان التحول من إدخال موقع منفرد فان النتيجة المتوقعة من اختبار ٢٠ خط يتكون من ٤ – ٦ خطوط بدون أية نباتات موجبة (هذا يوضح أن النسل به صفات متجانسة متنحية والعزلات من النوع البرى) ، أربعة –٦ خطوط كلها نباتات متجانسة موجبة مما يوضح أن النسل به صفات متجانسة سائدة (متحولة وراثيا) أما الثمانية وحتى الاثنى عشر سيكون بعضها نباتات موجبة وأخرى سالبة من انفرادات غير متجانسة الزيجوت .

٥-البذور الناتجة من الخطوط التى بها نباتات كلها مهندسة وراثيا (نباتات متجانسة الزيجوت متحولة وراثيا) يمكن أن تجمع وهذه ستكون مخزون التقاوى للصنف الجديد المهندس وراثيا وتقسم الى أربعة مجموعات .

٦-البذور من المجموعة الأولى تستخدم لإنتاج ١٥ نبات على الأقل . يتم زراعة هذه النباتات تحت ظروف نموذجية لإنتاج ١٥٠ مجموعة نباتية من نفس التقاوى الذاتية . يتم زراعة ونمو المجاميع جنبا الى جنب فى خطوط قصيرة فى الحقل . يتم فحص الخطوط للكشف عن التجانس والتماثل . أى خط يحتوى على نباتات غريبة غير متماثلة يزال . الخطوط الباقية المتجانسة والمتماثلة تحصد كل منها مستقل عن الآخر وتنمى مرة أخرى ويستبعد أى نبات غريب فى الموسم التالى فى خطوط طويلة . مرة أخرى يتم فحص الخطوط وتستبعد أية نباتات غير متجانسة . إذا كان ضروريا يتم أخذ نباتات كعينات من الخطوط وتختبر للتعبير الجينى المنقول .

٧-المجموعة الثانية من التقاوى تستخدم فى اختبارات الكفاءة . فى هذه الحالة يتم اختبار النباتات لتحديد ما إذا كانت درجة التعبير الجينى أو النشاط تتوافق مع المتطلبات التجارية . بالنسبة للخطوط المقاومة لمبيد الحشائش نبدأ كتجارب مصغرة تتضمن خطوط فردية للنباتات أو حتى نبات واحد فى كل قطعة تجريبية وربما مع ثلاثة معاملات (صفر ، ١ ، ٢ المعدل الموصى به من المبيد) واثنان من الطرز الوراثية (الخط المتحول وراثيا والصنف الأب) . البذور الناتجة من هذه التجربة يحتفظ بها وتستخدم فى السنوات التالية للاختبارات حيث ان الكمية الكبيرة من التقاوى تسمح بإجراء تجارب موسعة فى مساحات كبيرة مع تكرارات كثيرة وفى مواقع متعددة .

٨-المجموعة الثالثة من التقاوى تستخدم كمصدر لزيادة البذور لتزويد مخزون البذور بكميات كافية لإجراء التقييم الخاص بالصفات الزراعية والجودة . بعد زيادة البذور تجرى تجربة زراعية صغيرة حيث تنمى النباتات وتتم مقارنة خط النباتات المتحولة وراثيا مع الصنف الأبوى وربما مع الأصناف التجارية الجارية . الزيادة الثانية مطلوبة لأن الدراسات الزراعية تتطلب عمل مكررات فى قطع تجريبية متعددة للحصول على بيانات عقلانية عن الصفات الكمية مثل المحصول . تجرى تجارب مماثلة أو أكثر عقلانية فى الموسم التالى فى مواضع متعددة لتحديد كيف سيكون أداء الصنف المهندس وراثيا فى غياب مبيد الحشائش (أو المركب المستهدف) . نتائج هذه الاختبارات تستخدم لتحقيق تقييم فعال عن الأداء الزراعى .

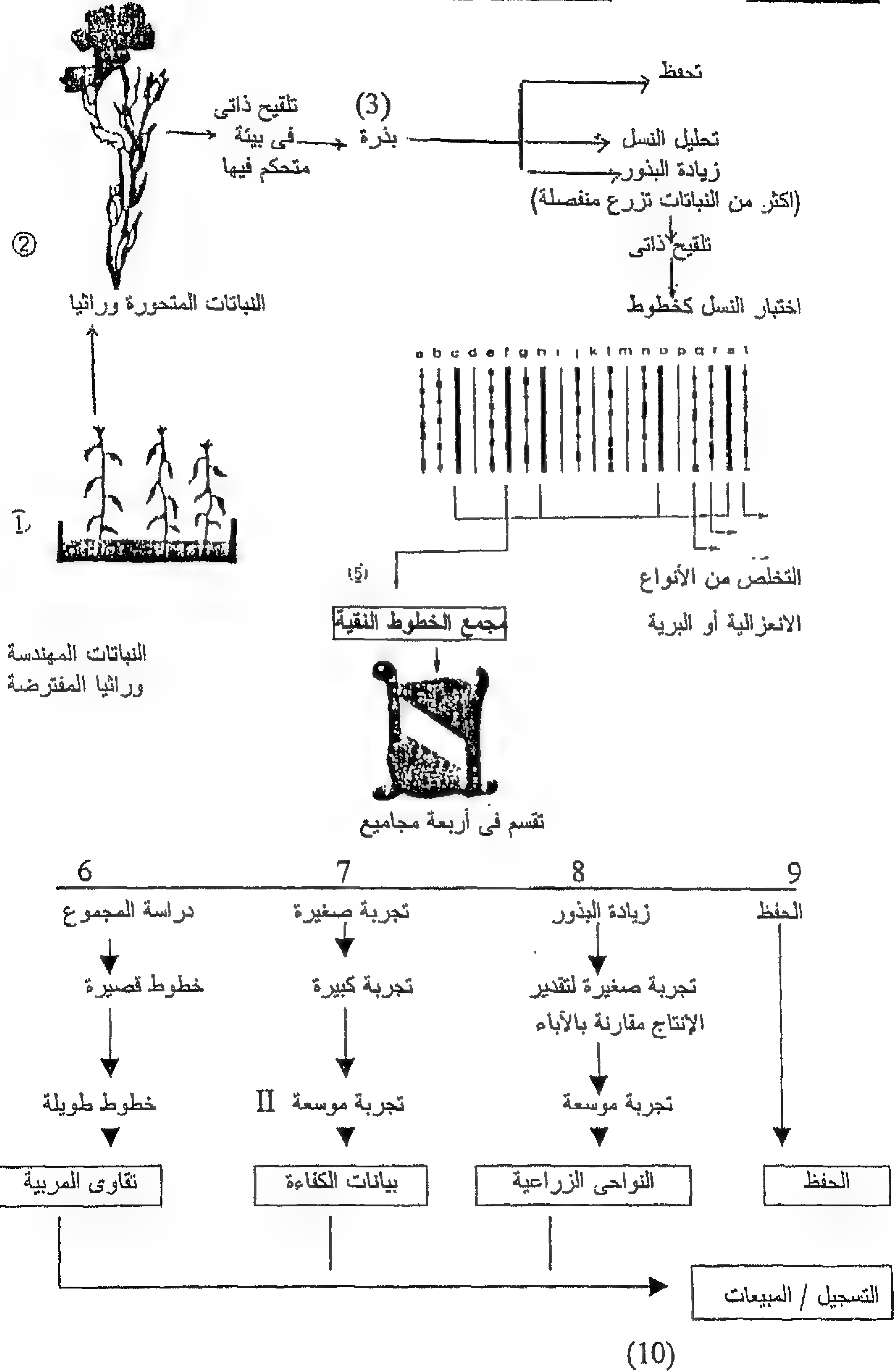
٩-المجموعة الرابعة من التقاوى تحفظ كمخزون احتياطي فى مكان آمن .

١٠-كل دولة لها متطلبات التسجيل الخاصة بها لأي صنف نباتي جديد ولكن المتطلبات الشائعة يمكن تحقيقها من خلال النقاط التالية :

أ – يجب تحديد كفاءة الصنف الجديد وتوثيق النتائج .

ب-مع فرضية أن درجة التعبير عن الصفة الجديدة المرغوبة تجاريا قد تحققت فان الأداء الزراعى يجب أن يكون جيدا على الأقل بنفس جودة الأصناف التجارية .

جـ-مع فرضية أن الكفاءة (المجموعة الثانية من التقاوى) والبيانات الزراعية (المجموعة الثالثة من التقاوى) مقبولة لدى الجهات التشريعية لتسجيل الصنف الجديد فان التقاوى الناتجة من التربة (المجموعة الأولى من التقاوى) تكون جاهزة للتسويق .



شكل (١٢-١) : إنتاج وتقييم الصنف النباتى المهندس وراثيا فى برامج التربية (ملخص)

الإصدارات التشريعية والتنظيمية

إن اكتشاف كائنات مهندسة وراثيا تحظى باهتمام كبير لدى العامة وتثير العديد من التساؤلات والانتقادات . إن مجالات النباتات المهندسة وراثيا وما يثار حولها واهتمام العامة بنشرها فى البيئة أدى فى كثير من الأحيان حظر نشرها أو إيقافها مؤقتا أو تقييد نشرها بأى صورة .

ثانيا : بروتوكولات تقييم فعالية المبيدات الحيوية فى مصر

مقدمـــــة :

بعد أن اختطت وزارة الزراعة المصرية استراتيجية الحد من استخدام المبيدات فى مكافحة الآفات وتعظيم الاتجاهات الحديثة الخاصة بالمكافحة المتكاملة للآفات والسيطرة عليها ثم إدارة التعامل مع الآفات تم الاتجاه الواسع العريض بالإدارة المتكاملة للمحصول كان لا بد من صدور تشريعات وتنظيمات تحقق هذه الأهداف . لقد كان التوجه الأعظم فى هذا المجال وضع سياسة ترشيد استخدام المبيدات وتعظيم دور العمليات الزراعية وعدم اللجوء للمبيدات إلا عند الضرورة القصوى ووضع العديد من المعايير الخاصة بالأمان البيئى وعلى صحة الإنسان . لقد أدت هذه السياسة الى تقييم العديد من المستحضرات الطبيعية والحيوية للتقييم تحت مسمى " بدائل المبيدات " وللأسف الشديد لم تكن هناك بروتوكولات لخطوات وسبل وطرق التقييم مما أدى الى نتائج بدت مشجعة ولكنها أدت الى كارثة عندما دخلت حيز التطبيق الفعلى ونتجت عن انهيار برنامج المكافحة المستنيرة الذى كان مستقرا على مدى عشر سنوات . لذلك تم تشكيل لجنة برئاسة أخى وزميلى وأستاذى الفاضل أ٠د٠ العيداروسى أحمد جمعة أستاذ المبيدات الكيميائية بكلية الزراعة جامعة الزقازيق وعضوية الأخوة الأفاضل رؤساء الأقسام بمعهدى بحوث وقاية النباتات وأمراض النبات لوضع بروتوكولات تقييم فعالية المبيدات الحيوية وقد آثرت ان أضع بعض لمحاته الأساسية فى هذا المقام دون تحريف .

تجدر الإشارة الى أن المبيدات الحيوية أبطأ عادة فى تأثيرها عن المبيدات الكيميائية ولذلك قد يلزم تكرار الاستخدام على فترات متقاربة ، وفى كافة الأحوال يجب تسجيل تعداد الآفة ومستوى الإصابة موضع الدراسة قبل بدء استخدام المبيد الحيوى مباشرة وعلى فترات دورية قبل كل معاملة ثم بعد فترات بعد آخر استخدام للمبيد الحيوى . ويقيم الفعل النهائى للمبيد الحيوى على أساس تعداد الآفة بعد آخر استخدام للمبيد الحيوى وعلاقته بتعداد الآفة ومستوى الإصابة بها قبل بدء الاستخدام . ويراعى تسجيل كافة الملاحظات

والبيانات العلمية عن تأثير هذه المبيدات على الكائنات الأخرى غير المستهدفة خاصة عناصر المكافحة الحيوية المتواجدة فى المساحة التجريبية والحشرات النافعة .

ويراعى توافر الشروط التالية فى المبيد الحيوى الذى يجرب تجت الظروف المصرية :

١-يجب ذكر كافة المعلومات عن المبيد الحيوي متضمنة الكائن الفعال والسلالة – إن وجدت – والنوع والجنس ومكان عزله والتوثيق العلمى لتعريفه ومستندات التوثيق والجرعة الفعالة ومدة الصلاحية وشروط التخزين ونظام الاستخدام وكيفية التقدير فى النظم المختلفة . وفى حالة وجود خليط من العزلات يجب ذكر بيانات كل سلالة على حدة والتأكد من أن كل سلالة تنطبق عليها كافة الشروط السابقة .

٢-يكون المبيد الحيوى واضح التخير ولا يكون له سلالات ممرضة لكائنات اقتصادية ونافعة فى الوسط البيئى مثل النباتات الاقتصادية ، عناصر المكافحة الحيوية ، الحشرات والحيوانات النافعة ، الكائنات الدقيقةُ النافعة للتربة ولايحتوى على كائنات دقيقة أخرى ممرضة وضارة للنظم البيئية .

٣-أن يكون مستحضر المبيد الحيوى خالي تماما من أى مواد سامة مضافة أو أية كيمياويات ضارة بيئيا – مثل المبيدات بأنواعها أو منظمات ومنشطات النمو للكائنات الحية .

٤-لا يفرز سموما جهازية تتسرب الى غذاء الإنسان أو الحيوان من خلال النباتات المعاملة .

٥-يسهل تنمية الكائن الحى الفعال للمبيد الحيوى على نباتات متوافرة غير مكلفة .

٦-نظرا لاختلاف سلوك الكائنات الحية فى النظم البيئية المختلفة فانه يجب قبل بدء التجريب الحقلى للمبيد الحيوى فى مصر فانه يجب إجراء التجارب تحت ظروف المعمل أو الصوبة أو الحقل المحدود بالجهات البحثية المتخصصة لتقييم ما يلى :

أ – القدرة الممرضة للمبيد الحيوى على النباتات الاقتصادية فى الوسط البيئى .

ب–القدرة الممرضة للمبيد الحيوى على عناصر المكافحة الحيوية (المتطفلات – المفترسات) .

جـ–القدرة الممرضة للمبيد الحيوى على الحشرات والحيوانات النافعة (مثـــل نحل العسل – دودة الأرض – الثدييات) . إضافة الى ذلك يتم دراسة التأثير على الكائنات الدقيقة النافعة فى التربة .

٧–يتم التوصية بالمبيد الحيوى بعد اجتيازه لمراحل الاختبار طبقـــا للـــبروتوكول الخاص بالأفة المستهدفة .

تتضمن البروتوكولات تفصيلات عن خطوات العمل مع كل نوع من المستحضرات الحيوية على حسب الأفة المستهدفة ويمكن الإشارة الى هذه البروتوكولات :

١–بروتوكول تقييم فعالية المبيدات الحيوية الفطرية ضد الذبابة البيضاء .

٢–بروتوكولات تقييم فعالية النيماتودا المتطفلة والممرضة للحشرات .

أ – ضد دودة ورق القطن .

ب–ضد حشرات الجعال .

جـ–ضد حضارات سوق وخنافس قلف أشجار الفاكهة .

د – ضد حشرة سوسة النخيل الحمراء .

٣–بروتوكولات تقييم فعالية المبيدات الحيوية ضد الآفات النيماتودية .

أ – بروتوكول تقييم فعالية المبيدات الحيوية البكتيرية .

ب–بروتوكول تقييم فعالية المبيدات الحيوية الفطرية .

٤–بروتوكول تقييم القدرة الممرضة للمبيدات الحيوية (الميكروبية) على طفيليـــات ومفترسات الحشرات .

أ – المبيدات الحيوية البكتيرية .

ب–المبيدات الحيوية الفيروسية .

جـ–المبيدات الحيوية الفطرية .

٥– بروتوكول تقييم القدرة المرضية للمبيدات الحيوية (الميكروبيـــة) علـــى نحـــل العسل.

٦–بروتوكول تقييم القدرة الممرضة للمبيدات الحيوية (الميكروبية) على الأسماك .

٧–بروتوكول تقييم فعالية النواتج الطبيعية ضد الآفات النمياتودية .

حيث أن الآفات النيماتودية تمثل خطورة كبيرة فى الأضرار بالإنتاجية النباتية ومـــن جهة أخرى فان المبيدات الحيوية بما فيها النيماتودية قد تلعب دورا كبـــيرا فـــى المســـتقبل

كإحدى أسس برامج السيطرة وإدارة مجابهة الآفات ... لذلك سأضع المقدمة التى ذكرت فى بروتوكولات تقييم فعالية المبيدات الحيوية ضد النيماتودا :

تهتم كثير من البحوث حاليا برصد الكائنات الحية الممرضة والمتطفلة والمفترسة للنيماتودا سواء كانت فطرية أو بكتيرية أو اكاروسية وكذلك رصد المواد والمركبات والمستخلصات الحيوية أما لكائنات حية أو لبعض أجزائها أو أعضائها الحية أو مستخلصات لناتج نشاط حيوى لبعض الكائنات الحية وتقييم مدى إمكانية استخدامها فى مكافحة النيماتودا بهدف الاقلال من استخدام المبيدات الكيميائية التقليدية للمحافظة على نظافة البيئة وسلامتها . وتبشر نتائج بعض الأبحاث العلمية التى تمت خلال العشر سنوات الماضية بإمكانية استخدام بعض تلك الوسائل الحيوية فى أغراض المكافحة . غير أن بعضها لا يزال فى نطاق البحث العلمى ولم يصل بعد الى مرحلة الاستخدام التجارى بالتطبيق في الحقول على نطاق واسع . ويلزم الإشارة هنا الى عدم توافر معلومات كافية عن الآثار الجانبية الناجمة عن استخدام هذه الوسائل الحيوية وتأثيراتها على النظم البيئية المختلفة مثل التربة والكائنات الحية غير المستهدفة سواء نباتية أو حيوانية وتأثير كل ذلك على سلامة الإنسان وغذائه وبيئته .

ويراعى كافة الشروط العامة السابق الإشارة إليها تحت بروتوكولات تقييم فعالية المبيدات الحيوية ، وبوجه عام يجب قبل بدء الاختبارات الحقلية توافر معلومات كافية عن الكائن الممرض ودراسة السمية الخاصة به والسموم التى يفرزها وقدرته الممرضة للنظم البيئية الهامة ، وكذلك التركيز الفعال (عدد الجراثيم فى وحدة الحجوم أو الأوزان أو التركيز المئوى) ومدة الصلاحية وطريقة الاستخدام (إما إضافة الى ماء الرى أو نثرا على سطح التربة أو بالدفن تحت التربة او خلطا بالبذور أو تكبيشا بجوار البذور أو التقاوى) ، وأيضا الشروط الخاصة باستخدام المبيد الحيوى فيما يتعلق بنوع التربة ونوع المحصول والظروف البيئية المناسبة ، وصلاحية الخلط مع الأسمدة الكيماوية أو العضوية وعدد مرات الاستخدام ومواعيدها وتوافقها مع مراحل نمو المحصول .

ويراعى تدوين كافة البيانات والمعلومات والملاحظات والنتائج تبعا لطبيعة الإصابة خاصة ما يتعلق بالمعاملات المختلفة ومتوسط أعداد الأطوار الحرة فى ٢٥٠ جرام تربة قبل المعاملة وعلى فترات دورية بعد المعاملة ، وأيضا متوسط عدد أكياس البيض فى ٥ جرام جذور طازجة (فى حالة النيماتودا ذات أكياس البيض) وعدد الأطوار اليرقية وكذلك إناث النيماتودا فى جرام من الجذور الطازجة (فى حالة النيماتودا داخلية التطفل) والنسب المئوية لقتل الأطوار الحرة فى التربة والأطوار اليرقية فى الجذور والإناث فى الجذور (النيماتودا للتربة و/أو الجذور) ، ويقدر معدل التعقد الجذرى (RGI) (فى نيماتودا تعقد

الجذور) . ويتم حساب معدل التكاثر للآفة (كما ذكر سابقا فى بروتوكولات تقييم فعالية المبيدات الكيميائية ضد النيماتودا) ، ويتم تدوين النسبة المئوية لكفاءة المبيد محسوبا من معدل تكاثر نيماتودا التربة و/أو الجذور – كما يتم تدوين إنتاجية المحصول وكافة الملاحظات والظواهر الثانوية التى قد تحدث على نمو النباتات والأشجار ويجب تحليل النتائج إحصائيا .

كى يقف القارىء على مكونات البروتوكول سأضع نموذج مختار عن بروتوكول تقييم فعالية المبيدات الحيوية الفطرية ضد الذبابة البيضاء :

خطوات العمل

يطبق بروتوكول – ٤ " تقييم فعالية مبيدات الآفات ضد الذبابة البيضاء " مع مراعاة ما يلى :

١- مستوى الإصابة لبدء استخدام المبيد

٢-٥ حشرة كاملة أو حورية لكل ورقة نبات .

٢- عدد مرات الرش المتتابع والفترة بين كل رشتين

يتم تحديدها بواسطة الجهة المتقدمة للتجريب .

٣- مساحة القطعة التجريبية

١٠-١٠٠٠ م٢ لكل مكررة على الأقل حسب المحصول المنزرع ومستوى التجريب .

٤- عدد المكررات

أربعة مكررات .

٥- حجم العينة النباتية

كما هو موضح بالبروتوكول – ٤ .

٦- نظام الفحص

أ – الحشرة الكاملة :

يتم فحص الحشرات الكاملة فى الصباح الباكر قبل تطاير الندى ويتم فحص ٣٠ ورقة نبات من كل مكرر تختار عشوائيا . وفى حالة تعذر ذلك تستخدم المصائد اللاصقة كما هو موضح فى البروتوكول –٤ .

ب- الأطوار غير الكاملة :

تؤخذ عينات ورقية ممثلة لكل مكرر ويتم فحص السطح السفلي للأوراق بواسطة عدسة مكبرة (٢٠ × على الأقل) أو بواسطة بنيوكلر ، ويراعى تحديد إن كان الطور غير الكامل حي أو ميت . ويمكن الاستدلال على موت البيض والحوريات والعذارى من تعرضها للجفاف وتغير لونها ليصبح مائل الى البنى وتبدو الحوريات مبططة وحوافها ملوية وملفوفة لأعلى . أما الأفراد الحية فتكون ممتلئة الجسم وذات مظهر حيوى ويميل الى اللون الحمى .

٧- فترات الفحص

يتم فحص عينات نباتية وتسجيل عدد الحشرات الكاملة لكل ورقة (أو مصيدة في حالة استخدام المصائد الأصلية) وكذلك عدد الأطوار غير الكاملة لكل ورقة وذلك في المواعيد التالية :

أ - قبل بدء استخدام المبيد الحيوى مباشرة .

ب- قبل كل رشة من الرشات المتتابعة مباشرة .

جـ-على فترات أسبوعية بعد الرشة الأخيرة للرشات المتتابعة على أن يتم تحديد فترات الفحص بعد كل رشة وبعد الرشة الأخيرة بواسطة الجهة المتقدمة للتجريب .

٨- اختبار التأكد من الإصابة المرضية للحشرات الميتة

يتم جمع عينات عشوائية من الأطوار الحشرية المختلفة الميتة من المعاملة والمقارنة.

ثم يجرى الاختبار التالى لتقييم الإصابة المرضية فى الحشرات الميتة :

أ - يحضر قرص بلاستيك به عدة ثقوب ويوضع فى طبق بترى به قليل من الماء - أو توضع ورقة ترشيح مبللة بالماء داخل الطبق .

ب- يوضع عدد معلوم من الحشرات الكاملة أو أطوارها غير الكاملة الميتة بحيث لا تتلامس مع الماء أو مع ورقة الترشيح داخل الطبق البترى فوق قرص البلاستيك أو بعيدا عن ورقة الترشيح المبللة ويغطى الطبق البترى ويكرر نفس الشيء مع عينات حشرية من المقارنة .

ج- تحفظ الأطباق البترى وبداخلها الحشرات على درجة حرارة حوالى ٢٠ م ± ٢ ، مع إظلام تام لتشجيع النموات الفطرية خارج الحشرة وذلك لمدة أسبوعين .

د - يتم فحص الحشرات لمعرفة سبب الموت وظهور نموات المسبب المرضى .

هـ-تقدر النسبةا لمئوية التى ظهر عليها نموات المسبب المرضى .

٩- البيانات

أ - تدون كافة الظروف التجريبية متضمنة موقع التجربة وتاريخ الزراعة وصنف النبات والمعاملات الزراعية وعدد الرشات المتتابعة ومواعيدها .

ب- تدون كافة الملاحظات الخاصة بالتأثيرات الجانبية لكل معاملة على النباتات الاقتصادية والحشرات الاقتصادية والحشرات الاقتصادية النافعة (كالنحل) .

ج- يدون تعداد الطفيليات والمفترسات في كل معاملة بما فيها المقارنة قبل المعاملة وعلى فترات الفحص بعد المعاملة .

د - يدون تعداد الحشرة الكاملة والأطوار غير الكاملة للذبابة البيضاء للورقة قبل بدء الرش وقبل كل رشة من الرشات المتتابعة ثم على فترات أسبوعية بعد آخر رشة .

هـ-تسجيل النسبة المئوية لخفض تعداد الحشرة وأطوارها الوسطية بعد كل رشة وعلى الفترات الأسبوعية بعد آخر رشة باعتبار التعداد قبل بدء أول رشة .

و - تسجيل النسبة المئوية للحشرات الميتة بسبب المبيد الحيوي .

١٠- حساب النتائج

تطبيق معادلة هندرسون وتلتون لحساب النسبة المئوية لخفض تعداد الحشرة الكاملة والأطوار الغير كاملة (بيض - حورية - عذراء) وذلك بعد كل رشة من الرشات المتتابعة وعلى الفترات الأسبوعية بعد انتهاء الرش باعتبار تعداد الطور الحشرى قبل بدء الرش مباشرة .

لقد آثرت بعد نهاية الموضوع أن أضع بروتوكول تقييم كفاءة المستحضرات الحيوية ضد حشرة سوسة النخيل الحمراء :

د - ضد حشرة سوسة النخيل الحمراء

خطوات العمل

١-**المحصول** : النخيل بأنواعه .

٢-**الآفة** : سوسة النخيل الحمراء *Rhynchophorus ferrugineus* .

٣-**النيماتودا المستخدمة** : مثل *1-Steinernema spp.* *2- Heterorhabditis spp.*

٤-**تصميم التجربة** : قطاعات كاملة العشوائية .

٥-**عدد المكررات** : ستة مكررات لكل معاملة والنخلة تمثل مكرر واحد .

٦-**مستوى الإصابة عند بدء التجربة** : يجب أن لا يقل عدد الأشجار المصابة عن العدد الذى يسمح باجراء التجربة بجميع معاملاتها .

٧-**إعداد النيماتودا** : كما فى حالة بروتوكول حفارات الأشجار .

٨-**مواعيد التطبيق** : خلال المدة من أواخر سبتمبر حتى نوفمبر والمدة من مارس حتى مايو .

٩- **خطوات التطبيق :**

أ - يتم عمل ثقوب صناعية فوق منطقة الإصابة على جذع النخلة وبعمق يتناسب مع قطر النخلة .

ب- تجهز النيماتودا للتطبيق فى موقع التجربة كما سبق ذكره فى بروتوكول دودة ورق القطن .

ج-يتم حقن الثقوب الموجودة على الجذع بكمية كافية من المعلق النيماتودى وذلك طبقا للجرعة المراد اختبارها مع تحديد عدد الأطوار المعدية لكل ميلليلتر معلق وذلك باستخدام محقن يدوى .

د - تكرر المعاملة مرة ثانية بعد أسبوع من المعاملة الأولى .

هـ-يتم غلق الثقوب باستخدام عجينة من نشارة الخشب والغراء أو أى مادة مناسبة.

١٠- **البيانات وحساب النتائج :**

تسجل كافة أعراض الإصابة على الفترات الدورية للفحص لمدة عام كامل طبقا لدليل الإصابة على النحو التالى :

(١) – خالية من الإصابة صفر % .

(٢) – من ١ حتى ٢٠% ويعنى سهولة نزع الثلاثة الصفوف الأولى من الجريد مع وجود افرازات صمغية .

(٣) – من ٢١ حتى ٤٠% ويعنى عدم قدرة النخلة على تكوين فسائل فى الموسم .

(٤) –من ٤١ حتى ٦٠% ويعنى عدم قدرة النخلة على الإثمار فى الموسم .

(٥) – من ٦١ حتى ٨٠% ويعنى جفاف الأوراق حتى الصف الثالث .

(٦) – من ٨١ حتى ١٠٠% ويعنى جفاف قلب النخلة وموت البرعم الطرفى أو انكسار النخلة .

ويراعى الفحص لمدة عام كامل وعلى فترات دورية نصف شهرية مع ملاحظة التسجيل قبل وبعد معاملة النخيل بالنيماتودا ويحسب متوسط شدة الإصابة كالآتى :

$$\text{شدة الإصابة} = \frac{(\text{١} \times \text{عدد النخل للمتسوى ١}) + \text{٢} \times \text{عدد النخل للمتسوى ٢}) + \ldots \times \text{١٠٠}}{\text{العدد الكلى للنخل} \times \text{أعلى مستوى إصابة (٦)}}$$

يحب الخفض المئوى للإصابة عند كل فترة كما يلى :

$$\text{الخفض \% للإصابة} = \frac{\text{متوسط شدة الإصابة الابتدائية} - \text{متوسط شدة الإصابة فى نهاية الفترة} \times \text{١٠٠}}{\text{متوسط شدة الإصابة الابتدائية}}$$

بعض المقترحات البحثية للاستفادة من التكنولوجيا الحيوية والبيولوجيا الجزيئية فى الحصول على مستحضرات حيوية ضد الآفات

لقد كلفت إحدى اللجان المنبثقة من اللجان العلمية لأكاديمية البحث العلمى والتكنولوجيا فى مجال وقاية النبات أن تقدم مقترحات بحثية كل منها يستلزم خمس سنوات فى إحدى نواحى التكنولوجيا الحيوية والبيولوجيا الجزيئية للحصول على مستحضرات طبيعية وحيوية تفيد فى مكافحة الآفات . لقد اخترت منها ثلاث مقترحات تم عرضها على شعبة وقاية النباتات برئاسة أستاذى الفاضل أ٠د٠ بكير عطيفة العالم الفاضل ذو الخبرة الواسعة فى كل نواحى وقاية النباتات والتكنولوجيا الحيوية .

١–مشروع بحثى عن " استخدام التقنيات الحيوية الجزيئية فى رصد متبقيات المبيدات " مقترح مقدم من أ٠د٠ عبد الخالق السباعى بكلية الزراعة جامعة الإسكندرية .

٢-مشروع بحثي عن " التقنيات الحيوية للحصول على نواتج طبيعية وحيوية لتحفيز الجهاز المناعى فى النباتات " مقترح مقدم من أ٠د٠ منير داوود (زراعة القاهرة) ، أ٠د٠ العيداروسى جمعة (زراعة الزقازيق) ، أ٠د زيدان هندى (زراعة عين شمس) .

٣-مشروع بحثي عن "تقنيات حيوية للحصول على كائنات ممرضة لآفات حشرية" مقترح من نفس الزملاء فى المشروع الثانى .

المقترح الأول : استخدام التقنيات الحيوية الجزيئية فى رصد متبقيات المبيدات

أولا : تثبيط انزيمات النظام المناعى بالأجسام المضادة كوسيلة لتقدير متبقيات المبيدات

منذ أوائل التسعينيات استخدم التغير فى النشاط الانزيمي للجهاز المناعى قبل وبعد تعرضه للمادة السامة وتأثير ذلك على الأجسام المضادة التى يتم تحضيرها نوعيا مما يساعد على التعرف على وقياس كميات المبيدات (Ferguson et al ، ١٩٩٣) .

وبعد ذلك من أحدث التطبيقات فى مجال استخدام النشاط الانزيمى للخلايا المناعية والتى تستخدم على نطاق واسع فى عمليات التشخيص الطبية . وقد أمكن تصنيع وحدات لقياس النشاط النسبي للانزيمات المناعية مما يسمى الـ Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) وهى تستخدم بنجاح فى تحليل المبيدات وضعيا وكميا كما سبق استخدام نفس الفكرة بنجاح فى أغراض التحاليل الطبية .

يمكن استخدام هذه الطريقة المستحدثة فى التعرف على وكذلك الرصد الكمي لمستويات المبيدات وكذلك الميكروتوكسينات فى عينات من الدم والسيرم والبلازما أو اللبن – الماء – الدم – مستخلصات التربة أو المواد الغذائية ... الخ .

وهى طرق متخصصة ونوعية وتعتمد على توفير المستحضرات المصنعة من الأجسام المضادة النوعية والمتخصصة لكل مبيد .

ثانيا : استخدام الكاشفات الحيوية فى قياس مستويات المبيدات

تعتمد هذه الطريقة على قياس بعض الأنشطة البيوكيميائية الأساسية واستخدام مستويات النشاط النوعى لبعض الانزيمات مثل MFO انزيمات الأكسدة فى الكبد أو الهرمونات فى عينات الدم من المتعرضين للمبيدات وفى ضوء مستويات التداخل مع نشاط هذه الأنظمة البيوكيميائية الحساسة يمكن استقراء مستويات للمبيدات التى تم التعرض لها .

ثالثا : أجهزة قياس النبضات العصبية والبيوكيميائية لتقدير مستويات المبيدات

منذ أوائل التسعينيات وبالتعاون بين المختصين فى تصنيع الدوائر الكهربية شديدة الحساسية من أنصاف الموصلات والتى تسجل أى تغيير دقيق الشبجنات الكهربائية نتيجة هجرة الايونات أو الجزيئات يمكن استخدامه فى رصد مدى التغير فى الطاقة الكهربائية نتيجة وجود مواد غريبة وبالمثل يمكن قياس النشاط الكهربائى للأنزيمات النوعية بين المستقبلات والناقلات العصبية فى النظام الطبيعى مقارنا بالنظام بعد التعرض للمواد السامة وعن طريق قياس هذه الفروق فى الهجرة الكهربائية يمكن قياس نوع ومقدار المبيدات فيما يسمى بوحدات القياس الكهربى البيولوجى Biosenors وقد أمكن عمل وحدات باستخدام نظام الكولين استريز فى قياس مستويات من مثبطات هذا النظام الانزيمى من المبيدات الفوسفورية والكاربامائية .

رابعا : استخدام الارتباط النوعى للبروتينات أو الأحماض النووية مع المبيدات كدالة لقياس التركيز

تعتمد هذه الطرق على النشاط البيوكيميائى العالى للبروتينات والأحماض النووية وميلها للارتباط مع المواد السامة مثل المبيدات . وعن طريق القياس الكمى النسبى لهذا الارتباط مع تركيز ثابت من كل من البروتينات أو الأحماض النووية يمكن قياس تركيز المبيدات المعروف بميلها لإحداث مثل هذا الارتباط .

خامسا : الاستشعار على البعد كوسيلة لرصد أماكن ومدى انتشار أعراض الإصابة بالأمراض أو الآفات بأنواعها على المحاصيل الزراعية

يمكن بالتعاون مع التصوير الجوى وتقنيات الاستشعار على البعد – تحديد أماكن ومساحات المناطق المصابة بالأمراض أو الآفات الحشرية .

مثل هذه الدراسات والبيانات مطلوبة لتعزيز البرامج القومية لرصد وتوقع نسبة الإصابة بالآفات والأمراض وبداية الأجيال لكل آفة – ومستوى انتشار الإصابة تمهيدا

لتحديد المواضع التى تحتاج التدخل بالمكافحة الكيماوية ضمن برنامج ترشيد المبيدات والمكافحة المتكاملة .

أهمية التقنيات الحيوية المستحدثة فى رصد متبقيات المبيدات حاليا ومستقبلا

تشير التوقعات العالمية عن تزايد مستمر لاستخدام مبيدات الآفات بأنواعها على مستوى العالم خلال العشرين عاما القادمة حيث سيزداد الإنتاج الزراعى للوفاء بالحاجات المتزايدة لسكان العالم .

فى ضوء هذه الحقيقة سيظل رصد مستويات المبيدات وتقدير متبقياتها ونواتج تحللها على شتى المنتجات الزراعية تصديرا أو استيرادا – أحد المسئوليات لوزارة الزراعة والأجهزة والوزارات المعنية .

لما كانت هذه المهام تثقل حاليا كاهل المعامل المركزية لتقدير المتبقيات – مما يتطلب زيادة عدد معامل التحليل ومضاعفة قدرتها وإمكانياتها الغنية .

لما كانت طرق التحليل التقليدية التى تعتمد على طرق التحليل الكروماتوجرافى بأنواعه تحتاج أجهزة مرتفعة الثمن وتزداد أثمانها عاما بعد عام . لذلك فان استخدام البدائل من التكنولوجيات الحيوية كوسيلة لرصد المبيدات ومتبقياتها هى الأنسب للمستقبل لأنها أقل تكلفة مما ييسر تكرار وحدات التحليل فى عدة معامل لخدمة تنمية الصادرات وكذلك لتحليل المواد الغذائية المستوردة فضلا عن مهام رصد مستويات المبيدات ومتبقياتها ونواتج تحللها فى المواد الغذائية وفى شتى صورة البيئة .

يستهدف المشروع تدريب إعداد كافية من الفنيين على وحدات التحليل باستخدام التقنيات البيولوجية المستحدثة .

المقترح الثانى : التقنيات الحيوية للحصول على نواتج طبيعية وحيوية لتحفيز الجهاز المناعى فى النباتات

تتجه استراتيجية مكافحة الآفات بجمهورية مصر العربية الى تعظيم الوسائل الوقائية لمكافحة الممرضات الفطرية والبكتيرية أو الآفات الناقلة لأمراض نباتية وبائية ومن بين هذه الوسائل الوقائية تحفيز الجهاز المناعى للنبات الاقتصادى ضد هذه الممرضات النباتيـــة أو الآفات الحشرية أو الحيوانية الناقلة لممرضات نباتية هامة اقتصاديا أو مدمـــرة لزراعـــات اقتصادية وذلك بمعاملة هذه النباتات بمستخلصات طبيعية أو حيوية نباتية أو حيوانية .

عناصر المشروع

أولا : دراسة حصرية مرجعية

يتم إجراء دراسة حصرية مرجعية تتضمن معلومات وافية وواضحة ومتكاملة حول النقاط الآتية :

١-مقاومة أو تحمل النباتات الاقتصادية للإصابة بآفات حشرية ثاقبـــة ماصـــة أو بأمراض فطرية أو بكتيرية وعلاقة ذلك بنظم ســمادية أو عنــاصر مغذيـــة أو معاملات زراعية.

٢-القدرة الدفاعية للنبات الاقتصادى ضد آفات زراعية حشــرية أو أكاروســية أو ممرضات فطرية أو بكتيرية أو فيروسية وعلاقة ذلك بمستخلصات طبيعيـــة أو حيوية نباتية أو ميكروبية أو حيوانية أو كيملويات محددة تساعد علـــى زيـــادة القدرة الدفاعية للنباتات أو قدرتها التحملية ضد آفات حشـــرية أو حيوانيـــة أو ممرضات نباتية .

٣-منظمات النمو النباتية والكيماويات الحيوية التى تؤثر إيجابيا فى القدرة الدفاعيـة للنباتات ضد آفات ممرضات هامة اقتصاديا .

ثانيا : دراسات معملية أو فى صوب

١-دراسة وتطوير نظم جديدة وسريعة لاستخلاص مواد فعالة من نواتج طبيعية أو كيميائية أو حيوية سواء نباتية أو ميكروبية أو حيوانية .

٢-دراسة قدرة مستخلصات لنواتج طبيعية أو كيميائية أو حيوية على زيادة القـدرة الدفاعية لنباتات اقتصادية ضد آفات ثاقبة ماصة أو ممرضات فطرية وبكتيريـــة أو فيروسية .

٣-التعرف على التركيب الكيميائى للمادة الفعالة فى المستخلص ودراسة الصفات الطبيعية والكيميائية له .

٤-دراسة سمية المادة الفعالة الناتجة من المستخلص لنواتج طبيعية أو حيوية أو كيميائية وتأثيرها على الكائنات المستهدفة وغير المستهدفة (نبات اقتصادى – نحل – أسماك – دودة الأرض – الكائنات الدقيقة فى التربة – الأعداء الحيوية) وكذلك التأثير الفورى والآثار الجانبية الأخرى وأيضا التأثير الطفرى وتشويه الأجنة وتقدير المستوى غير المؤثر ظاهريا فى كل حالة .

٥-عمل وتجهيز مستحضرات مناسبة للتخلص الناتج الفعال وتحديد كمية المادة الفعالة به وكذلك كميات المواد أو الإضافات الأخرى أيا كان مصدرها سواء من المستخلص أو مواد مساعدة ودراسة تأثير هذا المستحضر على الكائنات المستهدفة وغير المستهدفة .

٦-إيجاد طريقة متخصصة ومناسبة لتقدير المادة الفعالة فى المستحضر أو فى النظم البيئية الممرضة (نباتات – مجارى مائية – أحياء مائية – تربة) .

٧-دراسة التوافق بين استخدام مستحضر المستخلص الفعال ووسائل المكافحة الأخرى .

ثالثا : دراسات حقلية

يتم إجراء دراسات حقلية بهدف تقييم كفاءة مستحضر المستخلص الفعال ضد الآفات المستهدفة والممرضات التى تصيب الفول البلدى (آفات ثاقبة ماصة) والفول السودانى والفراولة مع التركيز على الآفات الثاقبة الماصة وتقارن الفعالية بأحد المعاملات القياسية والشائع استخدامها .

يتم التجريب طبقا لنظم اختبار مرجعية مناسبة وسليمة علميا . مع تدوين تفاصيل طريقة الاستخدام .

يتضمن التقرير تفصيلا لأهداف الدراسة والآفة أو المرض المستهدف والمحصول المنزرع وتفاصيل طريقة الاختبار وتركيب المستحضر ومحتوياته الكمية لكل مكون فعال وغير فعال .

تتضمن البيانات وصفا كاملا لتأثير المستحضر بمعدلات مختلفة على النباتات والأمراض والآفات موضع الاهتمام والكائنات النافعة وغير المستهدفة مع دراسة أى تغيير فى التركيب الكيميائى للنبات المعامل وللأجزاء المأكولة منه . ويراعى تدوين كافة

الظروف التجريبية متضمنا عدد المعاملات المتتابعة ومواعيدها وكافة الملاحظات والمشاهدات التجريبية مع تحديد النسب المئوية لخفض تعداد كل آفة وأطوارها المختلفة إن أمكن على فترات الفحص المختلفة وكيفية تقدير المادة الفعالة في المستحضر ومتخلفاتها فى النظم البيئية المعاملة .

يلزم التوصل الى مقترحات مؤكدة تجريبيا للسيطرة على الآفات والأمراض المستهدفة موضع الاهتمام بالمعاملة بالمستخلص الفعال وتوافق ذلك مع النظم الزراعية ووسائل المكافحة الأخرى .

الآفات المستهدفة

الآفات الثاقبة الماصة والأمراض النباتية التى تصيب الفول البلدى – الفول السودانى والفراولة .

المقترح الثالث : تقنيات حيوية للحصول على كائنات ممرضة لآفات حشرية

تهتم استراتيجية مكافحة الآفات بجمهورية مصر العربية بترشيد استخدام مبيدات الآفات الكيميائية والاتجاه نحو وسائل بديلة من أهمها تعظيم استخدام كائنات بكتيرية أو فطرية أو فيروسية أو نيماتودية أو بروتوزوية ممرضة لآفات حشرية هامة يتم عزلها من نظم بيئية نباتية أو حيوانية أو حشرية أو تربة محلية .

عناصر المشروع

أولا : دراسة حصرية مرجعية

يتم إجراء دراسة حصرية مرجعية تتضمن معلومات وافية وواضحة ومتكاملة حول الكائنات الممرضة المعروفة دوليا لأهم الآفات الحشرية والحيوانية التى تصيب نباتات القطن والبطاطس وأشجار الموالح سواء كانت هذه الممرضات ميكروبية أو نيماتودية أو البروتوزية مع ذكر معلومات كاملة حول أعراض كل منه والعوائل الحساسة لها والمدى العوائلى وحساسيتها للحرارة والعوامل التى تساعد على عنفوانها .

كذلك تقدم دراسة مرجعية حول الكائنات الحية النافعة (متطفلات – مفترسات) وغير المستهدفة وتحديد أهم الآفات الحشرية التى تصيب نموات القطن والبطاطس والموالح وعلاقة ذلك بالعوامل البيئية والزراعية السائدة فى مناطق الإنتاج .

ثانيا : دراسات معملية أو فى صوب

١-استكشاف كائنات دقيقة – بكتيرية – فطرية – فيروسية – بروتوزوية أو نيماتودية – ممرضة لآفة أو لآفات تصيب نباتات القطن – البطاطس والموالح وعزلها من النظم البيئية المناسبة (آفة – تربة – نبات) وتشخيصها والتعرف على الكائن الممرض (الجنس – النوع – السلالة – التركيب الجينى) مستخدما أكثر الطرق المتخصصة حساسية.

٢-دراسة شاملة لصفات وسلوك الكائن الحي فى بيئته الطبيعية وبعد إكثاره وكذلك قدرته على البقاء والتزايد والتكاثر في النظام البيئي وتقييم كفاءته الممرضة ومدى التخصص العوائلى للميكروب وتأثيره الممرض تحت ظروف بيئية متباينة وكذلك قدرته على تحمل الظروف غير المواتية (درجات حرارة – حموضة ...) وقدرته على إنتاج انزيمات خارجية أو غازات أو أية كيمياويات أخرى .

٣-تقييم القدرة الممرضة للكائن ضد النباتات الاقتصادية الهامة وعناصر المكافحة الحيوية (مفترسات – متطفلات) السائد والكائنات النافعة الأخرى حشرية وحيوانية (نحل العسل – دودة الأرض – الأسماك – الثدييات والكائنات النافعة فى التربة) . مع توضيح نوع التأثير الضار أو السام وأعراضه . إن وجدت – وكذلك دراسة تأثير مستحضر الكائن الفعال على الكائنات غير المستهدفة السابق الإشارة اليها وكذلك التأثير على العين والجلد والحساسية للبشرة .

٤-استكشاف وعزل والتعرف على أى إفرازات خارجية أو سموم داخلية للكائن الدقيق الفعال وتقييم صفاتها الطبيعية والكيماوية وفعلها الفسيولوجى فى النظم البيئية المختلفة (آفات – نباتات – كائنات نافعة) وللكائنات غير المستهدفة .

٥-دراسة مدى التوافق بين استخدام الكائن الفعال والسموم الداخلية والوسائل التقليدية السائدة لمكافحة الآفة المستهدفة .

٦-عمل وتجهيز مستحضرات للكائن الفعال – خالية من سموم خارجية وأيضا مستحضرات للسموم الداخلية للكائن والتى تم عزلها والتعرف عليها وتقييم كفاءة كل مستحضر ضد الآفة المستهدفة والكائنات النافعة غير المستهدفة .

٧-وضع طريقة متخصصة ومناسبة لقياس تعداد الكائن الفعال وكذلك لتقدير إفرازاته ومنتجاته الكيميائية تحت الظروف المناسبة فى نظم بيئية متنوعة حيوانية ونباتية وفى المستحضرات المستخدمة .

٨-وضع طرق قياس حيوية للكائن الفعال فــى مســتحضراته وكذلــك للملوثــات الميكروبية بالمستحصر التجارى .

٩-تطوير طرق الاختبارات الحيوية ضد الآفات المختلفة .

ثالثا : دراسات حقلية

يتم إجراء دراسات حقلية بهدف تقييم كفاءة الكائن الدقيق الممرض ضد افات هامــة اقتصاديا تصيب نباتات القطن أو البطاطس أو الموالح وذلك فى مناطق الزراعة السائدة لكل منها وفى التوقيت المناسب لكل حالة مع المقارنة بمعاملة قياسية بأحد المبيدات الموصى بها والشائع استخدامها لهذا الغرض . ويتم التجريب طبقا لنظم اختبار وبروتوكــولات اختبــار مرجعية مناسبة وسليمة علميا ويلزم تدوين تفاصيل طريقة الاستخدام .

يتضمن التقرير تفصيلا لأهداف الدراسة والآفة المستهدفة والمحصــــول المــنزرع وتفاصيل طريقة الاختبار وتركيب المستحضر ومحتوياته الكمية لكل مكون فعال وغير فعال والملوثات الميكروبية بالمستحضر وكمية السموم الداخلية الموجودة وكمية الكائن الفعال .

وتتضمن البيانات وصفا كاملا لتأثير المستحضر بمعدلات مختلفــة علــى النبــات الاقتصادى والآفات المستهدفة والكائنات النافعة والإنتاجية الاقتصادية ويراعى تدوين كافــة الظروف التجريبية متضمنا عدد المعاملات المتتابعة ومواعيدها وتدوين كافة الملاحظــات الخاصة بالتأثيرات الجانبية لكل معاملة على النبات الاقتصادى والكائنات غــير المســتهدفة (المفترسات – المتطفلات – النحل) وتحدد النسب المئوية لخفض تعداد كل آفة وأطوارهــا المختلفة إن أمكن على فترات الفحص المختلفة وتسجيل النسبة المئوية للحشــرات الميتــة بسبب الكائن الدقيق الممرض للآفة المستخدمة فى الاختبار مع تدوين طريقة تقديرها .

يلزم التوصل الى مقترحات مؤكدة تجريبيا للسيطرة على الآفات المستهدفة بالوسائل الحيوية والسموم الميكروبية والعمليات الزراعية بالإضافة الى مبيدات كيميائية تقليدية مــع إيضاح المزايا الاقتصادية لهذه المقترحات .

الآفات المستهدفة

القطن : دودة ورق القطن – ديدان اللوز بنوعيها .

البطاطس : فراشة درنات البطاطس – الذبابة البيضاء – المن .

الموالح : صانعات الأنفاق – الحشرات القشرية بأنواعها .

REFERENCES

Arnoldo, M., Baszuczynski, C., Bellemare, G. Brown, G. Carlson, J. Gillespie, B. Huang, B., MacLean. N. MacRae, W. Rayner, G. Rozakis, S. Westecostt, M. and Kemble, R. (1992). Evaluation of transgenic canola plants under field conditions. Genome, 35, 58-63.

Beachy, R. Loesch-Fries, S. and Tumer, N. (1990). Coat protein mediated resistance against virus infection. Annual Review of Phytopathology, 28: 451-474.

D'Halluin, K., Botterman, J. and DeGreef, W. (1990). Engineering of herbicide resistant alfalfa and evaluation under field conditions. Crop Science, 30, 866-71.

Feitelson, J. Payne, J. and Kim, L. (1992). Bacillus thuringiensis: Insects and beyond. Bio/Technology, 10, 271-5.

Haughn, G., Smith, J. Mazur, B., and Somerville, C. (1988). Transforma-tion with a mutant Arabidopsis acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides Molecular and General Genetics, 211, 266-71.

Kamalay, J., and Goldberg, R. (1980). Regulation of structural gene expression in tobacco Cell, 19, 935-46.

McHughen, A. and Holm, F.A. (1991). Herbicide resistant transgenic flax field test: agronomic performance in normal and sulfonylurea-containing soils. Euphytica, 55, 49-56.

Nelson, R., McCormick, W., Delannay, X., Dube, P., Layton, J., Anderson, E., Kaniewska, M., Proksch, R., Horsch, R. Rogers, S. Fraley, R. and Beachy, R., (1988). Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco masic virus. Bio/ Technology 6, 403-9.

Sanders, P. Sammons, B., Kanliewski, W., Haley, L., Layton, J., LaVallee, B., Delannay, X. and Tumer, N. (1992). Field

resistance of transgenic tomatoes expressing the tobacco mosaic virus or tomato mosaic virus coat protein genes phytopatho-logy, 82, 683-90.

Umbeck, P., Brton, K., Nordheim, E., McCarty, J. Parrott, W. and Jenkins, J. (1991). Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. Journal of Economics and Entomology, 84, 1943-50.

Vancanneyt, G. Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A. Willmitzer, L. and Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene.splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation Molecular and General Genetics, 220, 245-50.

الباب الثالث عشر
النواحي البيئية والتشريعية
لاستخدام الكائنات الدقيقة والنباتات المهندسة وراثيا

الفصل الأول

الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا

أولا : النواحي البيئية والتشريعية

مقدمـــــــــة :

التقدم المذهل الذى حدث فى طرق وتقنيات البيولوجيا الجزيئية على امتداد الحقبتان الزمنيتان الأخيرتان أدى الى الحصول على كائنات دقيقة محورة وراثيا (GMMs) تتضمن الفيروسات والبكتريا والكائنات الدقيقة واستخدامها على النطاق التجاري فى الأوساط المحتوية عليها أو لنشرها عن قصد فى البيئة . توجد استخدامات مبشرة للكائنات GMMs فى البيئة مثل حماية المزروعات (Lindow وآخرون ، ١٩٨٣ ، Blakeman & Fokkema ، ١٩٨٢) . والمكافحة الحيوية (Bishop وآخرون ، ١٩٨٨) والانهيار الحيويى (الانهيار للمخلفات الكيميائية) واستخلاص المعادن من الخام (Lindow وآخوون ، ١٩٨٦) . على نفس المنوال تم تطوير نباتات مهندسة وراثيا للاستخدامات الزراعية . نشر الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا GMMs يختلف فى الأساس عن الحالات الأخرى لأنه من الصعوبة بمكان تقدير التأثيرات البيئية بسبب المشاكل المتأصلة فى استكشاف الكائنات الدقيقة فى البيئة وتقويم تداخلاتها مع الأحياء فى التربة والماء . بالطبع ولن نخرج عن الحقيقة فى أنه إذا أمكن تمييز الاضرار التى لم تكن مرئية أو متوقعة بعد نشر الكائنات GMMs سوف تجابه موقف فى غاية الخطورة حيث قد يكون من المستحيل إدخال أية عمليات لمجابهة الموقف ولو أن هذا قد يكون أحد الخيارات لإعادة الوضع على ما كان عليه خاصة فى حالة النباتات أو الحيوانات المهندسة وراثيا ولو أن نشر الدنا المندمج خلال حبوب اللقاح من النباتات المتحولة قد يخلق نفس الصعوبات . الاختلافات الأساسية ذات أهمية خاصة فى وضع الدلائل الخاصة بنشر وتداول وتسجيل GMMs من قبل الوكالات التشريعية المسئولة عن إعطاء التراخيص .

لكى يمكن تقييم مخاطر نشر الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا GMMs فى البيئة نحتاج للحصول على إجابات دقيقة وعقلانية عن تساؤلات خاصة بايكولوجية الكائنات الدقيقة في البيئة . نود معرفة أى العوامل تؤثر على نمو وبقاء ونشاط وحركة هذه الكائنات خلال مكونات البيئة . من الضرورى كذلك توفر معلومات عن التأثيرات التى تحدث من جراء نشر كائنات GMMs على الأحياء الموجودة في الوسط من حيث تراكيب المجموع والمجتمعات وثبات "الدنا المندمج" وانتقاله الى الأحياء المستوطنة . لكى نجيب على هذه الأسئلة يجب أن يكون لدينا المقدرة على الكشف والتقدير الكمى لتركيزات الكائنات GMMs الكلية والحيوية المزروعة وغير المزروعة لقياس نشاطها الفعلى وتحديد وجود الدنا المندمج والتعبير عنه فى الكائنات المقدمة ومجموع الكائنات المتوطنة . مفتاح الحصول على هذه المعلومات يتمثل فى تطوير الطرق التى تسمح بالكشف عن GMMs المزروعة فى البيئة . لذلك تضافرت جهود العديد من الهيئات الدولية فى تطوير تكنولوجيا تمكن من الكشف وتقييم مخاطر الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا التى نشرت فى البيئة . من أفضل هذه الطرق النظام البريطانى الأساسى الخاص بما يختصر الى PROSAMo (برمجة نشر الكائنات الحية المنتجة والمحورة Programmed Release of Selected and modified organisms) والذى يدعم من قبل الحكومة البريطانية والمراكز البحثية والشركات الكبرى والتى تضطلع بتنشيط البحوث الخاصة بتقييم المخاطر والكشف عن أضرار البكتريا المهندسة وراثيا وكذلك النباتات (Killham ، ١٩٩٢) . نتائج هذه التجارب وغيرها من البحوث المماثلة قد ساهمت بشكل كبير فى وضع دلائل فعالة عن استخدام الكائنات الدقيقة والحية فى البيئة .

الكشف عن البكتريا المزروعة Detection of introduced bacteria

لا توجد طريقة للكشف الميكروبي كاملة تتوافق مع دراسات تقييم المخاطر والاستخدام الخاص بخليط من الطرق التقليدية والجزيئية يبدو ضروريا . طرق الكشف الميكروبى التقليدية والتى تتطلب فى الأساس زراعة على وسط فى المعمل غير دقيق لأنها لا تستطيع أن تكشف عن الخلايا غير القابلة للزراعة وهى منخفضة جدا إعتمادا على اختيار البيئة أو الوسط وظروف النمو . بالإضافة الى ذلك فان كفاءة استخلاص الكائنات الدقيقة المحورة وراثيا GMMs من عينات البيئة تختلف بين الكائنات ونوع العينات كما أن الطرق القياسية المطلوبة تقلل غالبا من حيوية الخلايا . على نفس المنوال فان طرق المناعة التقليدية قادرة على الكشف عن الكائنات الدقيقة ولكنها لا تقدم أى معلومة عن حيويتها ونشاطها . هذا القصور نشط محاولات الوصول الى وتطوير طرق جديدة خاصة فى

اتجاه الطرق الجزيئية التى تحقق الحساسية والاختيارية المطلوبة لاستكشاف كائنات GMMs والحمض النووى الدنا المندمج فى البيئة .

هذه الطرق تقع فى ثلاثة مجموعات رئيسية : الطرق المناعية ، طرق مجسات الحمض النووى ، المعلمات الجزيئية . طرق المناعية التقليدية زادت كفاءتها كثيرا من خلال التحسينات التى جرت لإنتاج الأجسام المضادة عديدة ووحيدة الكلونة وكذلك تطوير طريقة التحليل الخاصة بالأنزيم المرتبط بماسك المناعة Enzyme – Linked (ELISA) immunosorbent assay وكذلك الاستخدام النشط بالانسياب الخلوى Flow cytometry قد يستطيع التمييز وفصل الخلايا على أساس تداخلها مع الأجسام المضادة الخاصة المعلمة مع صبغات فلوريسينية خاصة . هذه الطرق المناعية يمكن ان تقدم معلومات عن الأعداد الكلية للخلايا ولكنها مازالت غير ممكنة الاستخدام لتقييم الحيوية أو النشاط . طرق المجسات Probing تتضمن الكشف عن تتابعات خاصة للأحماض النووية DNA أو RNA زادت الحساسية بشكل كبير مع استخدام تفاعل سلسلة البوليميريز PCR لتكبير تتابعات الهدف (Steffan and Atlas ، ١٩٩١) . لقد استخدم تكتيك PCR حديثا في محاولة للتقدير الكمى لثبات المادة الوراثية المقدمة فى التربة (Romanowski وآخرون ، ١٩٩٣) . لقد أدت هذه الدراسة الي الاقتراح بأن المادة الوراثية قد تكون ثابتة فى التربة لأسابيع أو حتى شهور بعد نشرها من الخلايا . بالإضافة الي ذلك فان DNA فى صورة البلازميد كان قادراً علي دخول البكتريا الحية وتم التعبير مما يدل على أنه مازال نشط بيولوجيا . مجس الحمض النووى حساس جداً ولكنه يقتفى آثر ويتعقب الدنا وليس من الضرورى عدوى وحقن GMM .

استخدام المعلمات الجزيئية قدمت مميزات كبيرة عن دراسات تقييم المخاطر بالمقارنة بالطرق التقليدية وغيرها من الطرق الجزيئية . هذا النظام الخاص بالمعلمات marker systems يجب أن يحقق عدة متطلبات :

١–الجين المعلم يجب ألا يحدث أى تعبير مؤثر معنويا فى المجموع الداخلى .

٢–يجب أن يكون قادر على التعديل والصيانة فى العائل GMM (هذا يعنى عادة كروموسومية الموقع) .

٣–التعبير يجب ألا يسبب أية تأثيرات ضارة على عمليات التمثيل فى العائل .

لقد استخدم عدد من معلمات الجين المناسبة ولو أن القليل منها وجد ملائم لأغراض الكشف فى البيئة . هذه المعلمات الجينية تشمل المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة

و Laczy (تشفير البيتا – جلاكتوسيداز) ، xy LE (يشفر الكاتيكول ٣,٢ – دايوكسى جنييز) ، Lux (يشفر لوسيفيريز) كل من هذه المعلمات يقدم إمكانيات مختلفة للكشف . استخدامات الجينات المعلمات الأخرى مثل gus (يشفر البيتا – جلوكورونيداز) (Jefferson ، ١٩٨٩) ذات استخدامات محدودة للكشف البيئى بسبب عدم قبول خلفية الكائنات الدقيقة ذات الـ gus الداخلى . استخدام جينات Lux أثبتت ميزات خاصة خلافا لنظم المعلمات الأخرى حيث أصبح ممكنا استكشاف التوهج الحيوى bioluminescene من العينات البيئية دون سابق استخلاص للبكتريا (Rattrocy وآخرون ، ١٩٩٠) كما أن حساسية الكشف بالتوهج الحيوى تسمح باستكشاف خلايا فردية فى الأرض (Silcock وآخرون ، ١٩٩٢) وكذلك الكشف عن المستعمرات الميكروبية على الأوراق النباتية (Waterhouse وآخرون ، ١٩٩٣) . بالإضافة الى ذلك فان العينات يمكن أن تستكشف دون تلف مما يعطى وقت كافى لإجراء الدراسات عليها .

لقد استخدمت أنواع متعددة من الطرق لإدخال الجينات العلامة فى العائل من الميكروبات المهندسة وراثيا GMM . الطريق الأكثر استقامة ومباشرة يتمثل فى إدخال الجينات العلامات على البلازميد كما فى إدخال جينات Laczy فى البسيدوموناس الفلوريسينى (Drahos وآخرون ، ١٩٨٦) والذى يمكن إدخاله حينئذ فى العائل بواسطة مجموعة من الطرق منها التحول والتثقيب الكهربى والتحولات . البلازميدات عديدة النسخ يمكن أن تستخدم وتقدم حساسية عالية للاستكشاف . هذا النظام ذات خلفيات عديدة مثل إعاقة الحمل الوراثى الثقيل على خلية العائل مما يقلل من مقدرته التنافسية فى البيئة وفقد البلازميد فى غياب الضغط الانتخابى الموجب أو الاختلاف فى عدد نسخ البلازميد كمردود للاستجابة لتغيير المعايير البيئية وكلاهما يخلق صعوبات كمية ونقل البلازميد الى المجموع المتوطن . هذه الطريقة من التعليم الوراثى للكائن الدقيق ذات استخدامات كبيرة فى الدراسات الخاصة بالعوامل التى تؤثر على نقل الدنا فى البيئة .

من الطرق البديلة الأكثر ثباتا لإدخال الجينات العلامة ما يتمثل فى إدخالها على الكرموسوم لخلية العائل ولذلك فأنها تتضاعف مع دنا العائل فى وجود الضغط الانتخابى . يمكن حدوث وعمل ذلك باستخدام ناقلات خاصة متكاملة والتى لا تستطيع التضاعف فى العائل المستهدف وحتى إدخال الجينات المطلوبة على موقع متخصص فى الكروموسوم عبر تقنية الدمج المتجانس (Cook وآخرون ، ١٩٩٣) . فى هذه الحالات فان الجينات العلامة عادة تقدم كنسخة منفردة وهذا قد يقلل من حساسية الاستكشاف . هذا العيب البسيط يمكن أن يعوض من خلال ثبات الدنا المكلون " Cloned DNA " .

لقد كان استخدام المعلمات المقاومة للمضاد الحيوى شائعة جداً لأنها تسمح بالاختيار المباشر للمجموع المعلم بواسطة الفرد فى أطباق على بيئة تحتوى على المضاد الحيوى والتى ستنتخب ضد المجاميع المعروفة . هذا الاختبار مفيد على وجه الخصوص للكشف وتمييز الكائنات الحية الموجودة بتركيزات منخفضة نسبيا . بالرغم من أن هناك عزوف عام من استخدام الكائنات المقاومة للمضاد الحيوى حيث ارتفعت الأصوات تنادى بعدم استخدام هذه الوسيلة وإدخال هذه الجينات المقاومة للمضاد الحيوى فى البيئة . أساس هذا التناول غير واضح حيث هناك خلفية كبيرة عن وجود البكتريا المقاومة للمضاد الحيوى فى البيئة والتى حدث من استخداماتها فى بعض الأوقات للانتخاب المباشر . كل المعلمات الجزيئية استخدمت بنجاح لاستكشاف وجود الكائنات المهندسة وراثيا GMMs فى العينات البيئية وتفصيلات كل نظام موجودة فى بعض الدراسات المرجعية المنشورة بشكل مثير للإعجاب (Pickup ، ١٩٩١ ، Prosser ، ١٩٩٤) .

لقد برزت تساؤلات خاصة بالنواحى الايكولوجية عندما ظهرت الاقتراحات الخاصة بنشر الميكروبات المهندسة وراثيا GMM . هذه تشمل ما إذا كان تركيب مجتمع الميكروبات ووظائفه سوف يحدث لها خلل من خلال العدوى إذا ما كان سيتم نقل "الدنا" المندمج فى المجتمع الأصلى . معلوماتنا عن الايكولوجية الميكروبية محدودة ولو أنها تتحسن باستمرار ومن أهم الأسباب التى أدت الى زيادة الاهتمام بالموضوع اقتراح نشر الكائنات المحورة وراثيا أو المنتجة فى البيئة . مع الوسائل الجزيئية التى ذكرت قبلا يمكن إجراء دراسات ذات معنى لإلقاء الضوء عن تأثير العدوى المدخلة على المجتمع الميكروبى الموجود . هذا يمكن اجراؤه باستخدام تجارب الميكروسوم والصوب الزجاجية والتى تجرى تحت ظروف متحكم فيها وتتطلب مدخلات حقلية محدودة وكلاهما يمكن تصميمها بحيث تجيب عن بعض التساؤلات حول الايكولوجية الميكروبية . تجارب النشر الحقلى قليلة نسبيا فى العدد وربما تعكس الحذر والحيطة التى تؤخذ حول هذا الموضوع من قبل السلطات التشريعية على مستوى العالم . مثال ذلك ما حدث فى أمريكا عام ١٩٩٢ حيث كان ينشر ويتداول بعض الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا GMM بما فيها بسيدوموناس أوريوفاسينس للتعبير عن جينات Laczy للاشيريشيا كولاى (Drahos وآخرون ، ١٩٨٦ ، Kleupfel وآخرون ، ١٩٩١) وعزلات P.fluoresces , P.syringae المحورة مع شطب خاص لجين ice nucleatim والذى يشار له ice – minms (Lindow and Ponoponlos ، ١٩٨٨ ...) وسلالة Clavibacker xpli المحورة كى تعبر عن جين الجاما – اندوتوكسين لبكتريا باسيلليس ثورينجينسيز وكذلك الطفرات الحيويةا لمتوهجة للزانثوموناس كامبيسترس (Shaw وآخرون ، ١٩٩١ ، ١٩٩٢ –أ) . العديد من هذه الميكروبات التى نشرت

صممت كى تضيف لمعلوماتنا حول ايكولوجية البكتريا مثل استخدام جينات Laxzy كــى تسمح بالكشف البيئى واستكشاف P.aureofaciev واستخدام X.campestris المعلم Lux بما يسمح ببحث نشر الممرض النباتى . البعض يتضمن النشر القليل على المستوى الصغير للبكتريا مصممة لحماية النباتات مثل البطاطس والفراولة ضد التلف من التجميد ومثال ذلـك نشر P.fluorescens , P.syringae والتى حورت وراثيا للتخلص من جيناتها الخاصــة بالثلج النووى . هذه السلالات المحورة التى عدلت من البكتريا التى تعانى من خلل أو نقص الثلج النووى تستطيع استعمار النباتات ومنع نمو بكتريا الثلج النووى والتى تسـبب نقـص التلف من البرودة والثلج على المحاصيل . على نفس المنوال فان جين الجاما – اندوتوكسين لبكتريا باسيلليس ثورينجنسيز أدخلت فى C.xyli وهو نوع الحشائش كى يعمـل كوسـيلة مكافحة حيوية ضد ثاقبة الذرة الأوربية . فى المقابل وخلال هذه الفترة تم إجراء ما يقـارب من ١٩٠ اختبار حقلى مختلف للنباتات المحورة وراثيا . لقد حدث نفس الشيء فى إنجلـترا حيث تم نشر ما يقرب من ٥٠ تجربة من عام ١٩٨٦ وحتى ١٩٩٣ معظمها كانت خاصــة بالنباتات المهندسة وراثيا .

التشريعات التى تحكم نشر الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا GMM releases

من المنظور العام قامت السلطات المسئولة عن التشريعات علـى مسـتوى العـالم بوضع وتطوير اقتراب ما يسمى الحالة بالحالة Case – by – case لكل اسـتخدام حيـث يجب الحصول على تصريح مسبق بنشر هذه الكائنات الدقيقة ولـو أن التشـريعات تبقـى مختلفة من بلد لأخرى . اعتبارات الأمان الأساسية تختلف عن تلك الموجودة فعلاً للتعـامل مع غيرها حيث أن الكائنات المحورة وراثيا ذات طبيعة خاصة جداً كما أن هنـاك تحـدى يتمثل فى أن نشر هذه الكائنات يجب ان يصمم بحيث يحقق لها البقاء فى البيئة . لقد عقـدت العديد من اللقاءات والمؤتمرات الدولية حول نشر هذه الكائنات تحت مسمى نشر الكائنـات الدقيقة المهندسة وراثيا REGEM (Sussman وآخرون ، ١٩٨٨) وعقـد المؤتمـر الثاني عام ١٩٩١ (Stewart – Tull and Sussman ، ١٩٩٢) بالإضافة الى عدد مـن البرامج البحثية تحت مظلة البيوتكنولوجيا وتقييم المخاطر قبل برنامج التكنولوجيا الحيويـة فى الدول الأوربية BAP (Economidis ، ١٩٩٠) وكذلـك مبـادرة PROSAMO (Killham ، ١٩٩٢) . السبب فى ضرورة وضع هذه التشريعات يتمثل فـى أن العلمـاء غير قادرين على التنبؤ بما قد يحدثه نشر تجارب الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا وكذلـك اعتقاد عامة الناس بأن نشر GMMs قد يسبب مخاطر على المدى الطويل على كـل مـن البيئة والصحة العامة (Kemp ، ١٩٩٢) . فى إنجلترا (Steele ، ١٩٩٣) وفى أمريكا

(Sharn وآخرون ، ١٩٩٢ ب) حدث تطوير وتبسيط على التشريعات المنظمة لنشر هـذه التكنولوجيا في أتبيئة خاصة نشر الكائنات الدقيقة المحورة وراثيا GMMs .

التشريعات الجارية فى المملكة المتحدة

فى إنجلترا وقبل نشر أى كائن دقيق مهندس وراثيا يجب الحصول على تصريح من وزارة البيئة البريطانية واسكتلندا وويلز . فى الناحية العملية تستقبل وزارة البيئة الإنجليزية توصيات ونصائح من العديد من اللجان المستقلة خاصة لجنة النشر للبيئة (ACRE) والتى تضم فى تشكيلها خبراء وممثلين من مختلف التخصصات مثل مجاميع الشئون الصحية والبيئة . قسم شئون البيئة (DOE) الآن هو المسئول عن التنسيق بين اعتبارات كل تطبيقات الكائنات المهندسة وراثيا وغيرها حيث أن هذا القسم هو الذى يعطى التراخيص بالتعاون والتنسيق مع الهيئات الحكومية الأخرى مثل إدارة الصحة والأمان (HSE) ووزارة الزراعة والثروة السمكية والغذاء (MAFF) ولجنة السوق الأوربية . الهدف الأساسى على المدى الطويل يتمثل فى وضع الدلائل العامة والتشريعات الخاصة بالنشر خلال الدول الأوربية . هذا يعتبر تقدم عقلانى حيث ان الكائنات الدقيقة لا تعترف بوجود حواجز فيما بينها خلال تجارب النشر كما أنها ذات فوائد واضحة للنشر التجارى بواسطة الشركات الأوربية .

طلب التصريح بتجريب أو نشر هذه الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا يقدم على استمارة موحدة متفق عليها وعلى الطالب أن يقدم كل المعلومات حول الكائن الحى المطلوب نشره وكذلك " الدنا " المندمج والتى سوف تستخدم بتباين تبعا للخطر المرتبط بالنشر والغرض منه . مثال ذلك لا يمكن التصريح بالنشر إذا كان الكائن المطلوب نشره هو الايشيريشياكولاي المهندسة وراثيا للتعبير عن توكسين ريسين toxin ricin (من النباتات) بسبب أن الريسين قاتل للإنسان وأنه سوف يمثل خطر غير مقبول على صحة الإنسان . هذا سوف يتعارض مع النشر المقترح لسلالة الريزوبيوم المهندس وراثيا من خلال جزىء الدنا لبلازميد الريزوبيوم الطبيعى الذى يقاوم المضاد الحيوى . وجود المقاومة للمضاد الحيوى سوف تسمح للكائن المحور بالاستكشاف فى البيئة وجمع معلومات عن ايكولوجية البكتريا وكيف أنها ترتبط بمقدرتها على تثبيت نتروجين الهواء الجوى . إن نشر مثل هذه الكائنات لن يسبب أضرار على البيئة أو صحة الإنسان وهو قد يقدم معلومات إيكولوجية ذات قيمة كبيرة . إن الموافقة على طلب الحصول على موافقة بنشر هذه الكائنات المحورة وراثيا يجب أن يشكل توفر العديد من المعلومات عن صفات ومواصفات المانح وأبوية ومستقبلات الكائنات الحية والعلامات الجينية الفينولوجية وكيف يمكن تعريف

الكائن وماذا عن حساسية طرق الكشف ومدى دخول واشتراك الكائن الحي فـي العمليـات البيئية مثل التغذية وتحلل المادة العضوية والتنفس . التشريعات الكاملة منشورة فى كتيـب قسم الشئون البيئية DOE تحت عنوان " التشريعات والسيطرة على النشر العقلانى للكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا (DOE ، ١٩٩٣) " .

التشريعات فى أستراليا

لقد وضعت دلائل تحدد نشر الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا GMMs على غـرار ما هو متبع في الدول الأخرى (التعديـل الوراثـي : التـهديد والوميـض ؟ ١٩٩٢ فـي استراليا). فى هذا الإصدار الحكومى الاسترالى أخذت فى الاعتبار الفوائد المؤثـرة لنشـر GMMs فى البيئة . مثال ذلك أن هذا النشر سيكون له تأثيرات إيجابية على البيئة ووضـع الاقتراح الأول عن سلالة البكتريا المحورة وراثيا والتى تثبـت النـتروجين "الريزوبيـوم" وجعلها مقاومة للمبيد الفطرى . تأثير هذا كان يتمثل فـي حمايـة هـذه البكتريـا المثبتـة للنتروجين من الضرر بواسطة المبيد الفطرى عندما ترش النباتات به لحمايتها من العـدوى بفطريات الجذور . استخدام هذه البكتريا سوف ينقص الحاجة لـدى مزارعـى اسـتراليا لاستخدام المخصبات النتروجينية (التى سوف تؤدى الى وجود مستويات عالية من النتريت والنترات في ماء الصرف و فى المراعى (Friend ، ١٩٩١) .

التشريعات فى حد ذاتها تنفذ بطريقة مماثلة لما يجرى فى بريطانيا . مع كل طلـب لنشر الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا GMMs يتطلب توفير كم هائل من المعلومات عـن مبررات النشر وتوضيح أسباب ومبررات فشل الطرق الأخرى أو عدم كفاءتها (خاصـة تلك التى لا تشترك في النشر) وتفصيلات عن التحور الوراثي وثباته وكذلـك التـأثيرات المعروفة للكائن غير المهندس وراثيا ونفس الشيء عن الكـائن المحـور علـى الإنسـان والحيوان وصحة النبات والإنتاج الزراعى والبيئة والدلائل والأدلة الخاصة بالثبات والتيسير ونشر الكائن المحور وتفصيلات كاملة عن تجارب النشر وترتيبات الاستكشاف ومـا هـي الخطط المتوقعة للتعامل مع الكوارث البيئية مثل الفيضان خلال النشر وطرق السيطرة للحد من الكائن بعد النشر . مطلوب معلومات إضافية أخرى اعتماداً على طبيعة الكائن المحـور وراثيا والاستخدام النهائى له . هناك مراتب خاصة مثل الفاكسينات الحية والكائنات الدقيقـة المرتبطة بالنباتات وتلك المرتبطة بالحيوان (مثل المجترات) والتى تستخدم فى القضـاء على التلوث والمقاومة الحيوية والكائنات الدقيقة التى تستخدم مع الغذاء . مع كل مرتبة مـن هذه المراتب يكون على المتقدم للحصول على الموافقة والترخيص بالنشر أن يجيب علـى ٢٣ سؤال مع ٢-١٣ سؤال إضافى اعتمادا على المرتبة التى يتبعها الكائن محل الاعتبـار. فى هذه المرحلة يؤخذ المقترح فى الاعتبار فى المعاهد المعنية بالأمان الحيـوى واللجنـة

الخاصة به (IBC) والتى ترسل المقترح الى اللجنة الاستشارية للتعديل الوراثـى GAMc. اللجنة الأخيرة تضم فى عضويتها خيرة العلماء والخبراء فى إنجلترا وهو يعينون بواسـطة الحكومة لمدة ثلاثة سنوات ولا تضم اللجنة أى أفراد من ذوى الخبرات الخاصة مثل خبراء الشئون البيئية أو الصحية . تقوم لجنة GAMc بدراسة المقترح مـع أخـذ كـل الدلائـل الموضوعة ثم تعد تقرير مفصل وترسله مرة أخرى الى لجنة الأمان الحيوى (IBC) ومنها الى الهيئة التشريعية المناسبة وهى تحمل المسئولية النهائية فى اتخاذ قرار النشر أو منعـه ويمكنها أن تستعين بأراء ذو الخبرات الخاصة فى هذا الشأن .

التشريعات في الدول الأخرى

معظم الدول النامية لا تملك تشريعات خاصة تغطى إنتاج أو نشر الكائنات الدقيقـة المهندسة وراثيا GMMs ويوجد على الأقل حالة واحدة موثقة تتضمن الفيروسات المحورة وراثيا مما خلق جدالا واسعا . فى عام ١٩٨٦ تم الوصول الى اتفاق بين معهد ويستار فـى فيلادلفيا بأمريكا وهيئة بان للصحة الأمريكية (PAHO) لإجراء تجربة صممت لاختبـار فاكسين المحور فى البقر فى مزرعة تجريبية فى مركز بان أمريكـان سـونوزيس وهـو يختصر الى (CEPANZO) فى الأرجنتين . لقد انتهت هذه التجربة فى سـبتمبر ١٩٨٦ من خلال السلطات الصحية الأرجنتينية التى قامت بتدمير الحيوانات التـى شـاركت فـى التجربة . المبررات لهذا الاجراء استندت على أن التجربة قد أجريت دون إذن أو تصريـح ودون تقديم أية معلومات للسلطات العلمية فى الأرجنتين . هذه التجربة شـملت اسـتخدام فاكسين الفيروس المهندس وراثيا والذى نوقش فى المؤتمـر الثـانى لمنظـم REGEMs (Sussman وآخرون ، ١٩٨٨) . الأساس فى النقد كان يتمثل في أن مجموعـة PAHO استوردت الفيروس المندمج الى الأرجنتين فى الحقيبة الدبلوماسية وهذا خرق للتشـريعات والقوانين الأرجنتينية حول استيرادا لكائنات الدقيقة الغريبة Exotic . بالإضافة الى ذلـك فان التجربة نفسها وإدارتها لم تلقى بالا وأهمية أو اعتبار لصحة وأمـان العـاملين الذيـن اشتركوا فى هذه التجربة وكذلك للتأثيرات الايكولوجية الخطيرة لفيروس الفاكسين .

إذا أخذنا كل النواحى الخطيرة التى تحيط بهذا الموضوع فى الاعتبار تبقـى هـذه التجربة فى الحسبان حيث يجب ألا يسمح بتكرار هذا العمل الإجرامى فى أى بلـد عنـده تشريعات ودلائل خاصة بالتعامل مع الميكروبات المهندسة وراثيا حتى لو كانت فاكسـينات بغرض التطعيم . التساؤل الآن ماذا عن تقييم مخاطر نشر الفيروسات المندمجة . مثال ذلك أن إضافة الدنا الغريب قد يؤثر على المدى العوائلى للفيروس المندمج وقد يؤدى نقل الدنـا الخاص للجين الغريب خلال الدمج بين الفيروسات الى إنتاج فيروس ذات مـدى عوائلـى مختلفة .

REFERENCES

Bishop, D.H.L., Entwistle, P.F. Cameron, I.R. Allen, C.J. and Posse, R.D. (1988). Field trials of genetically engineered baculovirus insecticidces, in The Release of Genetically Engineered Micro-organisms (eds M. Sussman, C. Collins, F. Skinner and D. Stewart-Tull), Academic Press, London. pp. 143-79.

Blakeman, J. and Fokkema, N.J. (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane Annual Review of Phytopathology, 20, 167-92.

Cook, N., Silcock, D.J. Waterhouse, R.N. Prosser, J.I. Glover, L.A. and Killham, K. (1993). Construction and detection of biolumines-cent strains of Bacillus subtilis. Journal of Applied Bacteriology, 75, 350-9.

Drahos, D.J., Hemming, B.C. and McPherson, S. (1986). Tracking recombinant organisms in the enviro0nment B-galactosidase as a selectable non-antibiotic marker for fluorescent pseudomonads. Bio/Technology, 4, 439-44.

Economidis, I. (1990). Biotechnology R & D in the EC: Biotechnology Action Programme (BAP) Parts I & II, Commission of the European Communities, Brussels.

Friend, J. (1991). Submission for a Microbial Release to the Australian Government, Submission 72, p. 6.

Genetic Manipulation: The Threat or the Clory? (1992) Report by the House of Representatives Standing Committee on Industry, Science and Technology. The Parliament of the Commonwealth of Australia, Australian Government Publishing Service, Canberra.

Herrero, M., de Lorenzo, V. and Timmis, K. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign

genes in Gram-negative bacteria. Journal of Bacteriology, 172, 6557-67.

Jain, R.K. and Sayler, G.S. (1987). Problems and potential for in situ treatment of environmental pollutants by engineered microorganisms. Microbiological Science, 4, 59-63.

Kluepfel, D.A., Kline, E.L., Skipper, H.D., Drahos, D.J. Barry, G.F. Hemming, B.C., Gooden, D.T., Hughes, T.A. and Brandt E.J. (1991). The release and tracking of genetically engineered bacteria in the environment. Phytopathology, 81, 348-52.

Lindow, S.E., Arny, D.C. and Upper, C.D. (1983). Biological control of frost injury. II. Establishment and effects of an antagonistic Environialherbicola isolate on corn in the field. Phytopatho-logy, 73, 1102-6.

Pickup, R.W. (1991). Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. Journal of General Microbiology, 137, 1009-19.

Shaw, J.J., Beauchamp, C., Dane, F. and Kriel, R.J. (1992). Securing a permit from the United States Department of Agriculture for field work with genetically engineered microbes: a non-prohibitory process. Microbial Releases, 1, 51-3.

Waterhouse, R.N., Silcock, D.J., White, H.L., Buhariwalla, H.K. and Glover, L.A. (1993). The cloning and characterization of phage promoters, directing high expression of luciferase in Pseudomonas syringae pv. phaseolicola, allowing single cell and microcolony detection. Molecular Ecology, 2, 285-94.

ثانيا : استعراض شامل عن الكائنات الدقيقة والتكنولوجيا الحيوية

الكائنات الدقيقة مخلوقات حية متناهية فى الصغر تشمل البكتريا والفطريات والفيروسات والأوليات الحيوانية . الفيروسات والبكتريا لها أشكال متعددة وتسبب أمراض النبات والحيوان والإنسان . من البكتريا ما هو نافع كتلك التى تثبت آزوت الهواء الجوى وتستخدم فى صناعة الألبان ودبغ الجلود وصناعة السماد العضوى واللقاحات المتخلفة والأمصال . البكتريا هى حجر الزاوية فى تقدم وتطور التكنولوجيا الحيوية لدرجة أنه يطلق عليه : الثورة العلمية الرابعة للقرن العشرين أو ما يحلو للبعض ان يسميها بثورة الهندسة الوراثية . الفطريات بعضها يستخدم كغذاء مثل عيش الغراب وبعضها يدخل فى صناعات متعددة مثل الخميرة وإنتاج المضادات الحيوية والكثير من الفطريات ضار للنباتات والإنسان وبعضها يفرز سموم ضارة بالإنسان والحيوان . الأوليات الحيوانية سواء فى التربة أو المياه العذبة والمالحة تسبب أمراض للإنسان والنبات والحيوان ومن أشهرها بلازموديوم الملاريا . لسنا فى حاجة للقول والتذكرة بالأعداد المهولة للكائنات الدقيقة وتنوعها الرهيب ودورها الكبير في إحداث التوازن البيئى . لقد ساهمت الكائنات الدقيقة فى التوصل الى العديد من الاكتشافات والإنجازات مثل :

- التأكيد على أن المادة الوراثية فى الكائنات الحية هى الحمض النووى DNA وليس البروتين .
- اكتشاف الأنزيم القاطع .
- استخدام البلازميد فى البكتريا في عمل أو تركيب حمض نووى .
- إكثار الحمض النووى المعاد تركيبه وعمل ملايين النسخ .
- وسيلة لنقل الحمض النووى .
- المصدر الرئيسى للمحصول على أنزيمات الوصل أو الالتحام .
- الحصول على أنزيمات لدراسة تتابعات وترتيب القواعد النتروجينية على شريط الدنا .
- الحصول على الأنزيمات اللازمة لتصنيع الحمض النووى .
- الحصول على الجينات الخاصة بمقاومة الحشرات والفيروسات والمبيدات .
- تستخدم كمفاعل حيوى لتصنيع الهورمونات .
- تستعمل كمبيد حيوى .
- تستخدم فى تحويل المخلفات الزراعية .

- وسيلة لجعل النبات مصنع لإنتاج اللقاحات .... وغيرها من الاستخدامات التى كانت فى مصاف الأحلام فى الحقبة الماضية ... أليس كل هذا ثورة رابعة بعد ثورات ثلاثة (تحطيم الذرة – ارتياد الفضاء – عالم الكمبيوتر ...) .

مرة أخرى أشير الى دور الكائنات الدقيقة فى إنتاج الغذاء الطبيعى (الصبغات ومواد النكهة – مركبات حلوة قليلة السعرات) من خلال التخمير . هل يعلم الكثيرين أن الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا تستخدم للكشف عن فساد الأغذية من خلال عزل قطعة صغيرة من الحمض النووى للكائن المسبب للفساد واستخدامها كمجس للكشف عنه (كما هو الحال فى الكشف عن السالمونيللا) . لقد حدث تقدم كبير فى هذا الاتجاه من خلال استغلال البلازميد (قطعة الحمض النووى فى البكتريا وعليه بعض الجينات ذات الخصائص المعنية وبذلك أصبح فى الإمكان التعرف على أى جين مرغوب . قيمة كل كائن تتحدد بمحتواه من الجينات المرغوبة وبذلك فان التنوع البيولوجى واجب الحفاظ عليه بهدف الحصول منه على الصفات المرغوبة وتحسين الصفات الوراثية للكائنات الحية خاصة الدقيقة . تكنولوجيا الحمض النووى المندمج أو المعاد تركيبه rDNA تعتبر من أهم الوسائل للحصول على كائنات دقيقة تؤدى وظائف معينة . نحن نتوق لبنك التقاوى على مستوى العالم العربى وفى نفس الوقت نتوق أكثر لبنك للجينات فى السلالات النباتية والحيوانية مع توصيف صفات كل سلالة ولتصبح الجينات قوة استراتيجية على مستوى العالم العربى فنحن لسنا أقل مقدرة من العالم المتقدم . يمكن الاستفادة من هذه البنوك الجينية من خلال تقنية الحامض النووى المعاد تركيبه الى التحكم فى النمو والبناء والتطور وتحويل الجينات وما يستتبع ذلك من قفزات هائلة فى الطب والزراعة والصيدلة . أليس فى الإمكان نقل جين من كائن دقيق كالبكتريا الى الحيوان أو النبات ... سبحانك يا قادر لا علم لنا إلا ما علمتنا ... .

قد يقول قائل وماذا فى هذا التوجه بعمل بنك للجينات على مستوى العالم العربى ؟ هل فى هذا صعوبة ؟ ألسنا نملك قاعدة علمية جيدة وإمكانيات هائلة ؟ الإجابة نعم ولاغرابة ولكن ليكن معلوما أن مزارع الكائنات الدقيقة ذات الصفات المرغوبة والجينات المتميزة التى تصلح للأبحاث وتطبيقات التكنولوجيا الحيوية يجب أن تحفظ فى نتروجين سائل على درجة حرارة –١٩٦ °م . لذلك فان حفظ المعلومات الوراثية مكلف للغاية ومع هذا فهو ممكن وضرورى وحتمى .

للكائنات الدقيقة دور كبير سوف يتعاظم فى القرن الحالى فى تصنيع المواد الغذائية الثانوية مع مضافات الغذاء للحفظ من التلف والمواد التى تعطى المذاق الحلو أو تلك التى تحسن الطعم والروائح والعطور مثل رائحة الخوخ والتفاح والنعناع والبرتقال ... أى أن

كل ما سنأكله فى المستقبل القريب والآن سيكون ناتجا من الكائنات الدقيقة وليس من طريقة زراعة الخلية . هناك بروتين الثوماتين الذى يوجد فى ثمار نبات كاتميف فى غرب ووسط أفريقيا وهو ذو حلاوة ٢٠٠٠ – ٣٠٠٠ مرة حلاوة السكر وقد نقل الجين الخاص بإنتاج هذا البروتين من النبات الى البكتريا ثم نقل لنبات الدخان والخميرة ... كل شيء أصبح ممكنا بفيض من الخالق العظيم ... .

عن دور الكائنات الدقيقة فى حماية البيئة من التلوث حدث ولا حرج . هذا الاقتراب يوفر الطاقة والوقت والجهد والتكاليف . هذا المجال فى حاجة الى تطوير لأنه ليس كما يظن الكثيرين يمكن تحقيق التخلص من الملوثات بوضع الكائنات الدقيقة مع الملوث وانتهى الأمر . الأمر معقد بل غاية فى التعقيد لأن هناك ثلاثة اقترابات فى هذا المجال هى : القطع الى أشرطة عن طريق التهوية أو تحويلها إلى معادن وإنتاج غاز ثانى أكسيد الكربون أو الميثان فى النظم اللاهوائية ، ادمصاص المعادن على مواد ادمصاصية ثم التخلص والإزالة، التحويل الحيوى بالكائنات الدقيقة Biotran sformation وهو بيت القصيد . الهدف من التحول الحيوى بالكائنات الدقيقة تحويل الملوثات الكيميائية الى معادن وثانى أكسيد الكربون بمسارات معينة سوف نعلم بعضها ولكن الكثير من هذه المسارات سيظل فى علم الغيب لا يعلمها إلا الخالق العظيم . الوصول الى هذا الهدف يتطلب معرفة شاملة وكاملة عن الكائنات الدقيقة وطبيعتها والتوازن والتداخلات فيما بينها حيث التنوع البيولوجى موجود ومحدد . إذا لم تعرف كل مخرجات ونواتج عملية التحول الحيوى يمكن الحصول على نتائج عكسية حيث أن بعض النواتج خاصة المعادن قد تكون هى الأخرى ملوثة ضارة بل أشد ضرراً من الملوثات الأصلية . لقد ساهمت الكائنات الدقيقة من خلال تكنولوجيا التحول الحيوى فى تخليص مياه الكويت من بقية الزيت الرهيب ... ولكن ماذا حدث بعد ذلك ؟ كتمان فى كتمان ... آه من غولاء المركبات الايدروكربونية خاصة تلك التى تحتوى على الهالوجينات إذا لم تتحول حيويا بصورة آمنة ؟ يمكن استخدام التحول الحيوى فى تخليص المياه الجوفية والتربة والمياه السطحية من الملوثات الكيميائية . يا سادة لا تتسابقوا نحو استيراد السلالات الخاصة بهذه الكائنات الدقيقة من الخارج ... أرضنا غنية جداً بكل هذه الكائنات التى تأكل الملوثات أكلاً وتخلصنا من هذا الشر الفظيع من أيدينا .

من الصدف العجيبة أنه فى طريقى لمكتب شركة سوميتومو كيميكل حيث أعمل مستشاراً علميا لها تناولت إذاعة البى بى سى فى لندن الموجهة بالعربية موضوع الملوثات البيئية وعلاقتها بنقص المناعة فى الإنسان وأشارت الى أنه سيعقد غداً ٣ ديسمبر ٢٠٠٠ مؤتمر فى جوهانسبرج بجنوب أفريقيا لمناقشة هذا الموضوع الخطير يحضره ممثلون عن العديد من الدول والهيئات والمنظمات المعنية بهذا الموضوع . لقد كان ذلك متواكبا مع

الكتاب الذى أصدرته منذ سنتان عن المبيدات والكيميائيات ودورها فى الانقــلاب الجنســى وفقد المناعة من إصدار شركة كانزا جروب للطباعة والنشر فى جمهورية مصر العربيــة . تناولت النشرة الإنجليزية الإشارة الى بعض المركبات الكلورينية خاصة الـــددت والــدداى وقالت انه تأكد أن النساء اللاتى يرضعن أطفالهن رضاعة طبيعية ينقلون إليهم المبيد خــلال اللبن . هذا الوضع المتردى كان من أحد الأسباب التى أدت الى الاهتمام بسلامة الأطفـــال والرضع من خلال تناولهم ألبان الأمهات اللاتى تعرضن للمبيدات . من هذا المنطلق شـــدد قانون حماية جودة الغذاء FQPA على هذا الموضوع وأضاف الى متطلبات تقويم المخاطر Risk assessement التعرض الرحمي للأجنة وضرورة إجراء اختبارات الكشـــف عــن مستوى الاستروجين لمعرفة علاقتها بالملوثات حيث أنها ترتبط بحدوث انقلاب فى الجنــس ونقص المناعة . لقد تأكد أن هناك سلالات من بكتريا بسيدوموناس ذات مقدرة على القيــام بالتحلل الحيوى لملوثات مسرطنة مثل PCP وكذلك PAH (ايدروكربونات عطرية عديـدة الحلقات) .

الشيء بالشيء يذكر حيث تستوطن التربة عديد مـــن الكائنــات الدقيقــة الضـــارة بالنباتات من فطريات وبكتريا وغيرها وتسبب أضراراً فظيعة فى الإنبات واستقامة النباتات فها هى أمراض الشلل والذبول وخناق البادرات وعفن الجذور والتـــى تكـــافح بـــالمبيدات بشراهة مما أدى الى تفاقم مشكلة تلوث التربة ومياه الصرف والمياه الجوفية والمزروعـــات بهذه السموم الخطيرة . بالإضافة الى ذلك فلا يمكن أن ننكر ما أحدثته هذه المبيـــدات مــن خلل فى التوازن الطبيعى بين الكائنات النافعة وبعضها البعض أو الضارة وبعضها البعــض او الضار والنافع معا وما يستتبع ذلك من خفض الخصوبة وظهور مشاكل أخرى قد تكــون أكثر تعقيداً . سبحانك يا رب خلقت الداء وخلقت له الدواء وكل بمقدار وميزان دقيق . هــذه الكائنات الضارة فى التربة لها أعداء طبيعية قد تكون من نفس الجنس أو النوع . لذلك فــان التعرف على هذه الأعداء النافعة يفتح مجالاً كبيراً للمكافحة المستنيرة والنظيفة ويا حبذا لــو تدخلت الهندسة الوراثية فى تعظيم شراسة هذه الأعداء النافعة فى القضاء على الآفات ولكن يجب أن يحدث ذلك بحساب ومقدار حتى لا نحل مشكلة ونخلق مشاكل أخرى نحـــن فـــى غنى عنها . لقد نجحت الهندسة الوراثية فى دمج البروتوبلاست الخاص بأكثر من كائن نافع فى كائن واحد (فطر مثلا) ليؤدى أغراض متعددة فى منظومة حماية النباتات والســـيطرة على الآفات . هناك مجال آخر للهندسة الوراثية يتمثل فى تعريف الجينات المســئولة عــن مقاومة الآفات لفعل المبيدات والتخلص منها وخلق سلالات حساسة .

لقد كثر الكلام عن خطورة الكائنات الدقيقة المحولة بالهندســـة الوراثيـــة وأثـــيرت تساؤلات عديدة عن تأثيراتها البيئية وظهرت آراء واجتهادات كبيرة بعضها يثـــير التشـــاؤم

اكثر من التفاؤل وهذه ظاهرة صحية خاصة مع تكنولوجيات خاصة قد تحمل فى ظاهرها الرحمة بينما فى باطنها العذاب كما حدث مع المبيدات والسموم الأخرى . من المخاوف التى أثيرت ومازالت أن استعمال الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا قد يؤدى الى التعبير عن صفات غير موجودة فى الآباء وهذه قد تكون غير مرغوبة كما ان هناك احتمالات لنقل هذه الصفات الوراثية للكائنات الأصلية الموجودة فى البيئة أما الاحتمال الخطير هو أن هذه الصفات الجديدة قد تسىء الى البيئة مما قد يضر بصحة الإنسان . الدراسات الخاصة بنقل المعلومات الوراثية بين البكتريا بصرف النظر عن الطريقة التى أتبعت (الارتباط – والنسخ والتحويل ...) . أما الدراسات الخاصة بسلوك الكائنات المهندسة وراثيا فى البيئة الأصلية مازالت قليلة للغاية . لا يمكن إنكار احتمال حدوث تبادل للمعلومات بنسبة كبيرة بين البكتريا من نوع واحد وفى عائل واحد كما هو الحال مع العقد الجذرية فى جذور البرسيم وقد يحدث نفس الشىء بين الأنواع المختلفة كما هو الحال بين الريزوبيا والبسيدوموناس وهذا يتوقف على وجود بلازميد ذات مجال عوائلى واسع .

السؤال الآن عن ماهية وحقيقة الأمان الحيوى للإنزيمات الناتجة بالهندسة الوراثية ؟ هناك توقعات عديدة تشير الى أن أكثر من ٨٠% من الأنزيمات التى تنتج بحلول عام ٢٠٠٠ ستكون بواسطة البكتريا المحسنة وراثيا . هذه الأنزيمات تشمل الأميليز والبروتييز والليبيز وغيرها . الأنزيمات نواتج طبيعية صديقة للبيئة ذات أمان عالى . صناعة الانزيمات بالطرق الحيوية ومن خلال تقنيات الهندسة الوراثية وتكنولوجيا الحمض النووى المعاد تركيبه rDNA أصبحت فى المرتبة الثانية بعد صناعة الدواء . لقد ثبت أن هذه الكائنات المحورة وراثيا لا تشكل خطورة على الإنسان والحيوان ولا تلوث البيئة . مع هذا فقد أشارت الوكالات المعنية بالأمان الحيوى الى ضرورة الاحتياط والحذر . ها هى وكالة حماية البيئة الأمريكية اضطلعت بمراجعة كل الطلبات التى قدمت إليها سواء بغرض الاختبارات والتجريب أو بغرض التسجيل للكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا خاصة تلك التى تستخدم فى مكافحة الآفات الضارة . لقد تم حتى الآن تسجيل ما يزيد عن ٣٠ مركب حيوى كمبيدات آمنة وكما أكرر دائما الأمان نسبى وليس مطلق . نفس النهج أتبع مع الكائنات المهندسة وراثيا فى صناعة الأسمدة أو حماية البيئة الحيوية . بالطبع لا تغفل هذه الوكالات البعد الاقتصادى والاجتماعى لإدخال هذه المنتجات من التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية . تشترط وكالة حماية البيئة الأمريكية أن يتضمن طلب اختبار أو التصريح باستخدام الكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا بيانات عن الكائن الدقيق والسبل التى اتبعت فى تحسين ومكان الاختبار والبيئة المحيطة بالمكان وتعميم التجربة وكيفية إدخال الكائن الدقيق فى البيئة والميزة الاختيارية للكائن الدقيق وحركة الجين . تجدر الإشارة الى وجود قواعد

وتشريعات تتضمن أسس تجميع وتحقيق وحفظ وتوزيع وإدارة مـزارع الكائنـات الدقيقـة والحمض النووى المعاد تركيبه . كل هذا من الأمور الهامة والتى تلعب دوراً رئيسياً فـى الحصول على المعلومات الوراثية اللازمة لتقدم التكنولوجيا والعلوم .

من الاسهامات الإيجابية لاستخدامات الكائنات الدقيقة المحسنة وراثيا إنتاج لقاحـات لأمراض الحيوان والإنسان داخل النبات باستخدام الكائنات الدقيقة حيـث تسـتخدم بعـض الفيروسات النباتية والتى تحمل تعاقب غريب من الببتيدات علـى غلافـها بمثابـة حـامل للأنتيجين . يتم وضع الأوليجوببتيد المصنع والمبرمج للأنتيجين الغريـب داخـل الغـلاف البروتينى للفيروس . لقد اتبعت هذه الطريقة فى فيروس بترقش نبات اللوبيا لإنتاج مصـل الحمى القلاعية والحصول على بروتين من نبات اللوبيا تفاعل الانتيسيرم الخاص بـالحمى القلاعية . ما أذهلنى حقا استخدام فيروس بترقش الدخان ليعبر عن الأنتيجين الخاص بطفيل الملاريا والآن يوجد فيروس بترقش الدخان يحتوى غلافة البروتين المعـاد تركيبـه علـى الأنتيجين الخاص بالملاريا . كذلك تم عزل بروتين من لعاب البعوضة هو الذى ينقل مسبب المرض . يجرى العمل الآن على تحفيز لقاح يهاجم الأطوار الخاصة بالطفيل التى تحـدث فى تيار الدم . إن إنتاج اللقاحات فى النباتات ضد الأمراض الوبائية يعتبر من الأمور الهامة للدول النامية بسبب توفر النباتات وقلة التكلفة . نتمنى أن نرى فى القريب العـاجل مصـل لالتهاب الكبد الوبائى من نباتات للقضاء على مأساة ما يقرب من ٣٠٠ مليون نسمة علـى مستوى العالم .

توجد الان مستحضرات تجارية تعتمد علىجين مأخوذ من بكتريا الباسيلليس مثـال مبيد فويل لمقاومة خنفساء الكلورادو وثاقبات الذرة على البطاطس كما يسـتخدم الغـلاف البروتينى للفيروسات (VCP) لإنتاج نباتات مقاومة لأكثر من فيروس . الأن توجد نباتـات تقاوم ٢٢ نوع من الفيروس .

الفصل الثانى

النباتات المهندسة وراثيا

مقدمـــــــــة :

لقد تقدمت طرق ووسائل الهندسة الوراثية للدرجة التى مكنت من توفير المنتجـــات الناتجة من دمج وهندسة الكائنات الحية للمستهلكين . إذا قصرنا الكلام بشيء من التخصص على النباتات يمكن القول أن كل المحاصيل الزراعية الهامة تقريبا قد تـــم هندســـتها فـــى مجهودات لتحسين واحد أو أكثر مقاومـــة للآفـــات (Gasser and Fraley ، ١٩٨٩) . المحاصيل التى تنتج نوعية أفضل من الغذاء أكثر مقاومة للآفات والاجهاد والضغوط البيئـة مع أنها تتحمل الأضرار السيئة التى تحدثها مبيدات الحشائش وهذه الأخيرة أصبحت حقيقـة وأمر واقع وسوف تظهر بكثرة فى القريب العاجل . هذه المنتجات ذات أهمية واقعية بشكل معنوى فى تحقيق الفوائد لمصنعى الغذاء والمستهلكين والزراعة بوجه عام . هذه المنتجـات ستكون أكثر تكلفة لإنتاجها وتصنيعها كذلك ستكون ذات قيمة غذائية عالية وسوف تحقـــق مرونة أكثر للفلاحين فى العمليات الزراعية المؤثرة . نظرة مستقبلية عن هـــذا الاقـتراب توضح أن النباتات قد تستخدم لإنتاج كميات كبيرة من الببتيدات المفيدة العلاجيـــة وكذلـك الدواء الكيميائى النادر مثل التاكسول بأسعار زهيدة . صناعة التكنولوجيـــا الحيويـــة فـــى النباتات وصلت الآن الى نقطة أصبحت عندها الاختبارات الحقلية للنباتات المحورة وراثيـــا (GMPs) محل تقدير على أنها خطوة عقلانية وحرجة فى تقييم الأمان والاقتدار التجـــارى والتأثيرات البيئية لكل منتج . يمكن القول أنه قد أجريت مئات من الاختبارات الحقلية علـــى مستوى العالم دون أية حوادث عارضة وتم إعداد تقـــارير علميـــة عنـــها (Ginzburg ، ١٩٩١ ، المركز القومى للبحوث ، ١٩٨٩ ، Halvorion وآخرون ، ١٩٨٥) وغيرهـــا . الوصول لهذه المرحلة فى العملية التجارية يتطلب العمل مع الهيئات الحكومية التى تملـــك السلطة للموافقة على إجراء الاختبارات الحقلية للنباتـــات المحـــورة وراثيـــا . إن طلـــب الحصول على موافقة السلطات المعنية لنشر النباتات المحورة على المستوى الحقلى يتطلـب تقديم كافة البيانات والمعلومات عن الكائن وطريقة التحويل والجيـــن وأصلـــه والمنتجـــات المعبر عنها ونواتج التعبير وتأثيراتها على البيئة . هذه البيانات تتأتى من الدراسات تحـــت الظروف المتحكم فيها مثل الصوب الزجاجية وحجر النمو .

النواحى التشريعية Regulatory aspects

استعراض ونظرة عامة

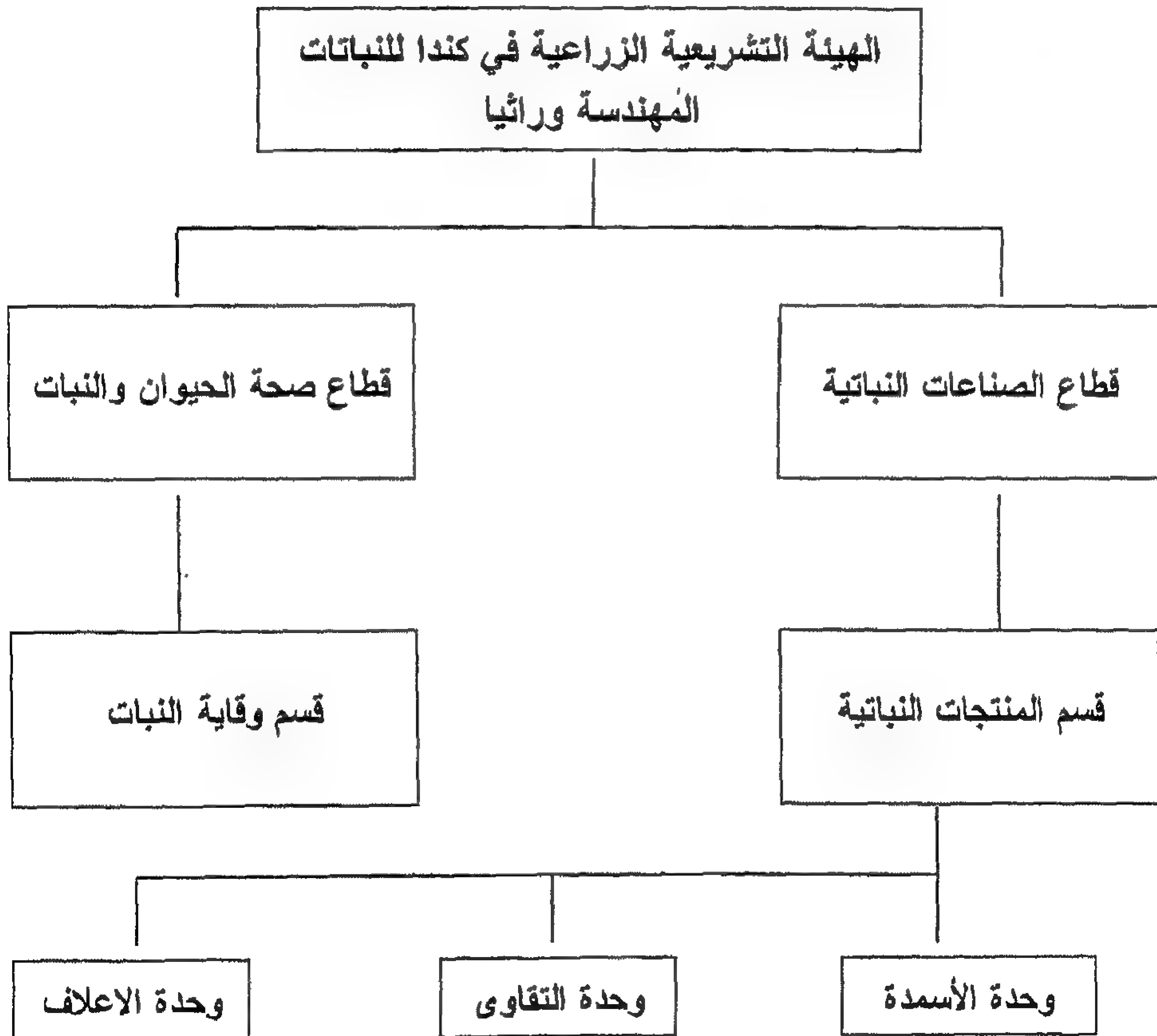
لقد قام مربى النباتات بالتحوير الوراثى للنباتات على امتداد قرون لتحسين الصفات الزراعية للمحاصيل ونباتات الزينة . فى كندا وأوربا توجد عملية للموافقة لكل الأصناف النباتية الجديدة بينما فى أمريكا لا توجد هذه المتطلبات . إن الاهتمام الزائد باستخدامات وكفاءة وإمكانيات اقترابات الهندسة الوراثية فى تحسين النباتات تطلبت اشتراك العديد من المكاتب والهيئات الحكومية فى عملية ودور التشريعات . فى كندا وأمريكا وأوربا واليابان تكون بعض الهيئات والوكالات التى تنظم الصناعات الزراعية والغذائية تحت مظلة القوانين القومية مسئولة عن نشر النباتات GMPs فى البيئة . مع مساعدة الخبراء الأكاديميين ورجالات الصناعة ومجموعة الخبراء العالميين وكذلك منظمة تطوير التعاون الاقتصادى (OECD) والدلائل تم تطويرها لتنظيم تسجيل والتعامل مع GMPs .

التشريعات فى كندا

الحكومة الكندية تعضد بقوة تطوير التكنولوجيا الحيوية فى كندا كوسائل ومداخل لتقوية التنافس الاقتصادى . التشريعات الكندية والنظرة الشاملة للتعامل مع النباتات المهندسة وراثيا GMPs تقسم بين ثلاثة وكالات . وزارة الزراعة الكندية التى تنظم المنتجات الزراعية الناتجة من التكنولوجيا الحيوية بما فيها الأعلاف الحيوانية والأسمدة والمبيدات والتقاوى والمواد البيولوجية البيطرية . تقدم هذه التشريعات نظام للتفتيش للتأكد من الجودة والأمان ونقاوة الأغذية . تتطلب الاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs فى كندا موافقة وتصريح من وزارة الزراعة الكندية وهى المسئولة عن تقييم الأمان البيئى للتجارب الحقلية تحت دلائل عملية التقييم البيئى والمراجعة . وزارة الصحة الكندية تنظم وتشرع وتراقب الأغذية ومضافات الغذاء والكيميائيات وغيرها من المنتجات التى قد تؤثر على القيمة الغذائية للأطعمة . وزارة البيئة الكندية تنصح وزارة الزراعة الكندية عن النواحى البيئية وزيادة تحسين جودة البيئة الكندية .

ووزارة الزراعة الكندية هى الوكالة القيادية عندما تأخذ فى الاعتبار النواحى التشريعية لاستخدام النباتات المحورة وراثيا فى الحقل (الشكل ١٣-١) . لقد طورت اقتراب مرن لتنظيم التعامل مع حزمة القوانين الموجودة . يبنى اقتراب الوزارة على تقييم كل مركب على حدة وتقييم كل حالة بحالتها Case-by-case مع التقييم العلمى للمخاطر المرتبطة بالنشر الحقلى لهذه النباتات المهندسة وراثيا . بناء على هذه المخاطر يتبع نظام ذو أربعة مراحل للتشريع . استخدام الصوب الزجاجية والمعامل (مرحلة -١) تعتبر ذات

أقل خطر ومن ثم لا تتطلب تشريعات . التجارب الخاصة بـــالبحوث فـــى نطـــاق محكـــم (المرحلة -٢) تعنى مخاطر متزايدة تتطلب تشريعات أما التجارب غير المحكمة لأغـــراض البحث (المرحلة -٣) والنشر التجارى (المرحلة -٤) كلها تتطلب تشريعات بسبب المخاطر المحتملة منها . منذ عام ١٩٨٨ أجريت ما يزيد عن ٣٠٠ تجربة حقلية فى المرحلة الثانيـــة مع القليل من تجارب المرحلة الثالثة . الجدول (١٣-١) يلخص أنواع التجارب الحقلية التى ووفق عليها عام ١٩٩٢ وأجريت فى ١٨ موقع عبر كندا .



شكل (١٣-١) : الهيكل التنظيمى المسئول عن النباتات المهندسة وراثيا GMPs فـــى وزارة الزراعـــة الكندية .

جدول (١٣-١) : ملخص للتجارب الحقلية التى تمت الموافقة عليها عام ١٩٩٢

نوع المحصول	عدد التجارب	نوع التجارب	عدد التجارب
البرسيم	٢	تحمل مبيد الحشائش	١٨٥
الكانولا	١٦٤	تحمل الإجهاد	٢
الكتان	٢٤	المقاومة للفيروسات	٨
البطاطس .	١٠	المقاومة للحشرات	٤
فول الصويا	١	زيادة الزيت	١
الدخان	٢	زيادة البروتين	١

قيم المنتجات النباتية فى وزارة الزراعة الكندية له كل مسئوليات وصلاحيات الموافقة على التجارب الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs تحت قانون التقاوى وقانون وقاية النبات والتشريعات منذ عام ١٩٨٧ . بالإضافة الى ذلك فان قطاع الصناعة النباتية ممثلاً فى قطاع المبيدات قبل ذلك فى وزارة الزراعة الكندية قد يتطلب موافقات للتصريح بإجراء البحوث تحت قانون منتجات مكافحة الآفات والتشريعات . وزارة الزراعة الكندية هى المنوطة بالموافقة على حركة استيراد التقاوى أو الأجزاء النباتية وكل نشر النباتات المهندسة وراثيا وإصدار متطلبات الأمان للتجارب الحقلية والتفتيش على مواقع النشر خلال فترة ومراحل الاختبارات للتأكد من أن ظروف التجريب الموضوعة قد أتبعت . قبل إصدار الموافقة يجب استكمال كل النواحى الخاصة بالتقييم البيئى والبيانات المرجعية (EARP) . التقييم البيئى يتطلب تحليل التأثيرات البيئية مع خريطة تفصيلية للموقع فى النظام البيئى الحيوى المحيط بمكان إجراء البحث وكذلك توفر أربعة مراتب عريضة من المعلومات :

١-المقدرة على التنبؤ بالسلوك والتأثيرات (يشمل تقييم الكائن وتركيبه وبقاؤه ونموه وتكاثره ونقل الجين والانتشار وتأثيراتها والتأثير على النظام الحيوى والنظم البيئية).

٢-القدرة على استكشاف الكائن الحى .

٣-القدرة لاحتواء الكائن .

٤-القدرة على التحكم والسيطرة على التجربة بما فيها استكشاف الموقع لسنوات عديدة بعد التجربة .

بالإضافة الى ذلك فان مسئولى حكومات الولايات تحاط علما ويطلب منـــها إبـــداء الرأى من خلال السلطات التشريعية الموجودة عندها عن موقع نشـــر النباتـــات المهندســـة وراثيا فى الحقول (Kalous and Duke ، ١٩٨٩) . المنظمات التى تشترك فى النشـــر الميدانى للنباتات المهندسة وراثيا يجب أن تستخدم اقتراب شديد القوة والعقلانية فى مجـــال الأمان البيئى . هذا يتضمن التخطيط للحركة واحتواء الموقع والتخلص من النفايات والبقايـا وإجراءات الطوارىء لمجابهة التسرب وحوادث النشر العرضى غير المطلوب . لا يســمح بحصاد أى محصول من نباتات التجارب الخاصة GMPs واســـتخدامها فـــى الغـــذاء أو الأعلاف التجارية دون إذن وتصريح مسبق من وزارة الصحة الكندية .

إن وحدة التقاوى التابعة لقسم المنتجات النباتية فى وزارة الزراعة الكندية مســئولة عن إعطاء الموافقات عن تسجيل الأصناف النباتية الجديدة وبيعها فى كندا . يتــم الموافقــة على الأصناف الجديدة بعد أن تحقق كل المتطلبات المفيدة merits خلال سنوات عديدة مـن المقارنات بين التجارب التعاونية بغرض التسجيل . خلافا لما هو موجود فى أمريكا حيـــث لا توجد تشريعات خاصة بدخول الصنف النباتى الجديد أما فى كندا تشترط التشـــريعات أن إدخال أى صنف جديد من المحاصيل الرئيسية (فيما عدا المحاصيل البســـتانية) بغــرض التجارة فى كندا يتطلب أن يسير فى خطوات التسجيل من خلال التجارب التعاونية . فـــى السنوات الحديثة دخلت الكانولا المهندسة وراثيا مجال التجارب التعاونية من خلال شـــركة مونسانتو جى تى كانولا (التى تحمل مبيد الحشائش جليفوسات وهو يحتوى علـــى المـــادة الفعالة لمبيد الراوند – أب) والكانولا التى تتحمل الباستا من خلال شركة هوكست (تتحمل المبيد جلافوسينات وهو المادة الفعالة لمبيد الحشائش باستا) . لقد تم خلق موقفين جديدين. الأول يتمثل فى عدم وجود رؤية أولية عن التحمل لمبيدات الحشائش كمرتبـــة مفيـــدة فـــى الجمعيات . حتى يمكن الاستجابة لهذا الموقف وافقت اللجنة الغربية الكندية للكانولا ولجنـــة التوصيات بزيت الشلجم (Wcc / PRC) على قبول معلومات إضافية على صورة بيانات من القطاع الخاص توضح ماهية وفوائد تحمل هذه النباتات لمبيدات الحشائش ومع هذا ظـل غير واضحا ما إذا كان التحمل لمبيد الحشائش يقدم مرتبة خاصة من الفوائد . الثانى يتمثـل فى أن وجود النباتات المهندسة وراثيا GMPs تستند بالضرورة أن تقوم وزارة الزراعـــة الكندية بتحديد مناطق وظروف عازلة وطرق للتخلص وتحطيم النباتات والتـــى لـــم تكــن مطلوبة من قبل . فى البداية وقبل وضع هذه التشريعات كانت البذور الناتجـــة مـــن هـــذه التجارب تباع على المستوى التجارى . منذ أن كانت النباتات المهندسة وراثيا بدون تنظيـــم أو تشريع على نفس منوال النباتات الناتجة من البرامج التقليدية للتربية ثم تحوير العمليـــات التعاونية .

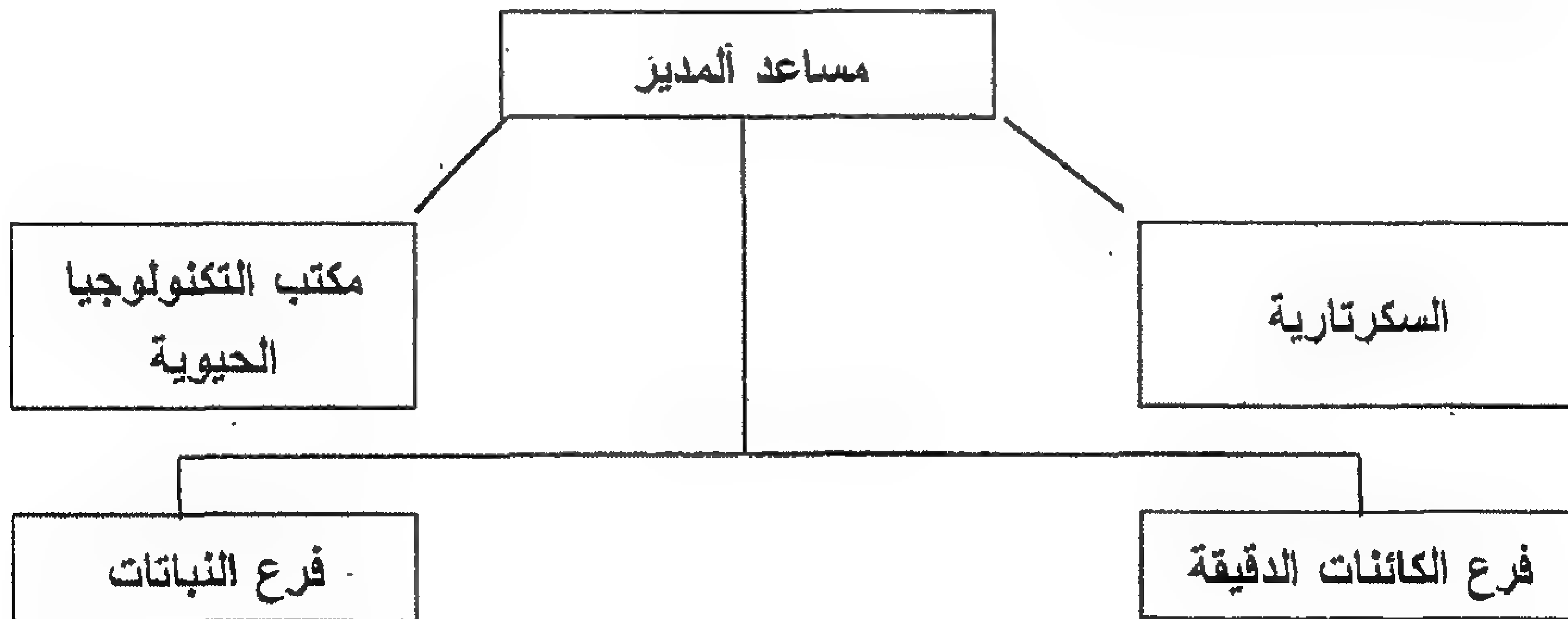
فى هذا الوقت لم تكن وزارة البيئة الكندية مشتركة بشكل مباشر فى الاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا . بناء على قانون وكالة حماية البيئة الكندية (CEPA) لاتشترك وزارة البيئة الكندية فى أية تشريعات طالما كانت هناك وكالات أخرى معنية بالموضوع . إذا ظهر أى دليل يشير الى أن البيئة الكندية غير محمية يكون هناك إجبار لأخذ دور فعال . بالرغم من عدم إشراكها فى إعطاء الموافقات والتصريحات ومتابعة أداء الاختبارات الحقلية فان وزارة الصحة الكندية لا تشترك عن قرب فى تطوير النباتات المهندسة وراثيا GMPs من منظور أمان الغذاء والأعلاف . تحت مظلة تشريعات الغذاء والدواء وكذلك CEPA فان وزارة الصحة الكندية تفترض وتضع سلطات لتنظيم التعامل مع الأغذية والأعلاف الناتجة من خلال الهندسة الوراثية . لقد أصدرت هذه الوزارة حديثا مقترح على صورة خطاب معلومات يوضح بالتفصيل خطة الوزارة لتنظيم التعامل مع هذه الأغذية (وزارة الصحة الكندية ، ١٩٩٢) . تتمثل الخطة فى تقييم الأغذية وعمليات التجهيز الجديدة والتى لابد وان تسبق تسويق الأغذية والأعلاف من الكائنات المهندسة وراثيا . تتوافق هذه التشريعات مع الدلائل التى وضعت حديثا فى المملكة المتحدة والتى تشترط تشريعات مبنية على التجهيز . هذا التعارض مع الدلائل التى اقترحت حديثا من قبل هيئة الصحة العالمية WHO , OECD وهيئة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) . تقوم السلطات الصحية الكندية حاليا بمراجعة المعلومات بناء على المدخلات العامة الواسعة من الجهات المهتمة بالموضوع وكذلك رجالات وهيئات الصناعة والتى تتطلب تنسيق مع الدلائل الدولية .

التشريعات فى الولايات المتحدة الأمريكية

يتم تنظيم التعامل مع النباتات المهندسة وراثيا GMPs والأغذية الناتجة منها بواسطة وكالتان فيدراليتان فى أمريكا . هذه الولايات تشمل وزارة الزراعة الأمريكية (USDA) وهيئة الغذاء والدواء الأمريكية FDA . هناك هيئة ثالثة تتمثل فى وكالة حماية البيئة الأمريكية (EPA) والتى عندها مسئوليات وصلاحيات تنظم التعامل مع المبيدات سواء استخدمت على النباتات أو أنتجت منها . دور الوكالات فى مجال النباتات المهندسة الوراثية يتمثل فى تطوير النباتات التى تعبر عن البروتينات القاتلة للآفات مثل بروتينات بكتريا باسيلليس ثورينجينسيز (B.t) . كل هذه الوكالات لها مسئوليات تشريعية مستقلة وتوجهات وقوانين مختلفة . الفلسفة العامة للتشريع فيما بين كل الوكالات يتمثل فى استخدام الاقتراب المبنى على النواحى العلمية على أساس كل حالة بحالتها . لقد أتفق ووفق على أن طريقة التحول ذات تأثير قليل على أمان المنتج . لقد أصدرت كل وكالة فى الوقت الراهن

مقترحاتها وأفكارها لتنظيم التعامل مع النباتات المحورة وراثيا ومنتجاتها الغذائية والمبيدات التي تنتج بواسطة النباتات .

قسم متابعة صحة الإنسان والحيوان (APHIS) يتبع وزارة الزراعة الأمريكية تنظم حركة ونشر النباتات المهندسة وراثيا وأجزاءها تحت سلطات ممنوحة لها من قانون الآفات الزراعية والحجر الزراعي . تقوم APHIS بإعطار التصاريح والموافقات لاستيراد والحركة بين الولايات أو نشر النباتات الناتجة من طرق الحمض النووي "الدنا" المتحول (شكل ١٣-٢) . الموافقات غير مطلوبة للتصدير . عندما تحتوى النباتات على مادة وراثية ناتجة من آفة نباتية فأنها تعتبر وتأخذ في اعتبارها المواد والفقرات التشريعية (الاستثناء الوحيد حتى الآن هو نبات أرابيدوبسيس ثاليانا المحور وراثيا والتي تعفى من التشريع) . البيانات المطلوبة للحصول على تصريح بنشر النباتات المهندسة وراثيا تشمل الكائن المانح، وصف الناقل ، التعبير عن الصفة المرغوبة ، الغرض من النشر ، المواقع ، البروتوكولات عدد الإدخالات ، مقاييس الاحتواء والتخلص منها . التصريح بالحركة المحدودة بين الولايات والاستيراد يتطلب بيانات مختلفة تشمل مواصفات المادة الخاضعة للتشريع وحركتها والأصل ومحطة الوصول لكل الشحنات ووصف إمكانيات الاحتواء ووصف الحاويات التي تستخدم خلال الشحن . كل ولاية تشترك بعملية التصريح . الطلب الخاص بالسماح بتداول النباتات المهندسة وراثيا GMPs ينسق بواسطة مدير الإدارة بمساعدة موظفى مكتب الأمان الحيوى وتراجع بواسطة فريق التكنولوجيا الحيوية الخاصة بفرع النباتات في APHIS (الشكل ١٣-٢) .



شكل (١٣-٢) : خريطة التنظيمات / التنسيق للحصول على موافقة وتراخيص APHIS

قبل السماح بالاتجار يجب ان تقوم هيئتى USDA / APHIS بالتحديد أن النباتات المهندسة وراثيا ليست آفة ومن ثم لا تخضع التشريعات تحت القانون 7 CFR340 (١٦ يونيو ، ١٩٨٧) . التوصيات والمعلومات التى يجب نشرها فى هذا التحديد نشرت فى مسودة (خدمات التفتيش لصحة الحيوان والنبات) تشمل :

١-عقلانية تطوير النباتات المهندسة وراثيا .

٢-وصف وراثية والوضع التقسيمى وصفات التلقيح وحشائشية المحصول .

٣-وصف نظام التحول والتتابعات التشريعية المستخدمة للحصول على النباتات .

٤-وصف الجينات المانحة .

٥-تحليل الأداء الوراثى والزراعى .

٦-التتابعات البيئية لإدخال النباتات المهندسة وراثيا GMPs .

٧-أية معلومات غير مستحبة كتلك التى تؤثر على التقديرات .

بحلول يناير ١٩٩٣ قامت شركتان بنشر وثيقة لتحديد الحالات التى لا تستدعى تشريعات من النباتات المهندسة وراثيا . لقد ووفق على إصدار شركة Caalgers لصنف الطماطم ® Flavr Savr بينما تم تعليق وثيقة شركة Asgrow الخاصة بالكوسة المقاومة للفيروس (من قبل خدمات التفتيش على صحة الحيوان والنبات ، ١٩٩٢ c,b) .

لقد تم تقديم طلبات وصلت للمئات الى وزارة الزراعة الأمريكية تطلب التصريح بإجراء اختبارات حقلية على النباتات المهندسة وراثيا GMPs . يزداد هذا العدد سنة بعد أخرى بمعدل يؤدى الى التصفية فى APHIS لأن عمليات التصريح الحالية تتطلب الكثير من الأهتمام . بالتبعية قامت وزارة الزراعة الأمريكية USDA بنشر مقترح مبنى على الخبرات التى تجمعت لديها خلال سنوات فى مجال التصاريح بالنشر الحقلى لهذه النباتات المحورة وراثيا والتى إذا اتبعت ستقلل بشكل معنوى كمية المراسلات والأوراق الواجب تقديمها قبل التجارب الحقلية . لقد شمل هذا الاقتراح عملية الإحاطة والمعرفة الكاملة عن النباتات المهندسة وراثيا قبل نشرها تؤكد أن هذه النباتات استوفت المعايير المطلوبة . فى البداية يجب أن نتأكد ان النبات واحد من الأنواع التالية : الذرة والقطن والبطاطس وفول الصويا والدخان والطماطم أو اى صنف أو نوع نباتى والتى تشير تقديرات الوكالة المعنية الى الأمان من حيث التكنولوجيا الحيوية والبيولوجيا وحماية البيئة . أية ظروف إضافية يجب أن تتضمنها وثائق واستمارات التسجيل خاصة تلك التى توصف بشكل كامل

مواصفات النباتات المهندسة وراثيا . طريقة وخطوات إجراء التجربة الحقلية يجب ان تبلغ كتابة لهيئة APHIS قبل الزراعة . هذا المقترح يعد تغيير كبير عما هو جارى فى الوقت الراهن وسوف يؤدى الى إصدار نداء APHIS تحت عنوان " القيود غير الضرورية على إدخال المواد الخاضعة للتشريع بناء على الخبرات المتوفرة " فى ٣١ مارس ١٩٩٣ تم نشر السياسة النهائية مع بعض التحوير على فترة الإحاطة . الإحاطة تتطلب ٣٠ يوما قبل النشر وعشرة أيام قبل حركة البذور المهندسة وراثيا .

هيئة الغذاء والدواء FDA تشترك فى التشريعات الخاصة بالمنتجات الغذائية من النباتات المهندسة وراثيا GMP المطلوب إدخالها للتسويق التجارى ولكنها لا تشترك مباشرة فى التجارب الحقلية . لقد نشرت FDA حديثا مقترحا يشمل مجموعة من الدلائل تعتمد على النواحى العلمية للتشريع للتصريح بتداول الأغذية والأعلاف المشتقة من النباتات المهندسة وراثيا . لقد اقترحت الهيئة اقتراب مبنى على نوع المنتج بما يتوافق مع ما هو معمول به مع النباتات العادية غير المحورة وراثيا . على غرار الدلائل الأخرى المقترحة من الوكالات الأمريكية توجد فترة ٩٠ يوم للمناقشة وإبداء الرأى لدى العامة . تأخذ وكالة FDA هذه الآراء لتغيير المقترحات الموضوعة أو تعديلها .

الوكالة الحكومية الثالثة المشتركة فى الاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs فى أمريكا هى وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA . فى الوقت الراهن تقوم هذه الوكالة بالتشريع وتنظيم التعامل مع المبيدات تحت مظلة القانون الفيدرالى للمبيد الحشرى والفطرى ومبيدات القوارض (FIFRA) والخاص بأى مادة أو مخلوط من المواد المقصود بها الاستخدام بهدف منع أو تحطيم أو طرد أو القضاء على أى آفة . تقوم الوكالة كذلك بتحديد ما إذا كانت بعض النباتات المهندسة وراثيا تقابل وتتمشى مع هذا التعريف وإذا كانت تدخل فى التشريع من قبل FIFRA كمبيدات نباتية . المبيد النباتى Plant-pesticide يعرف على أنه : مواد تكافح الآفات تنتج فى النباتات وأن إعادة الوراثية ضرورية لإنتاج هذه المواد . بالإضافة الى ذلك تقوم الوكالة بتحديد ما إذا كانت العلامات الوراثية المختارة سوف تنظم تشريعيا كمكونات خاملة . كمثال فان القطن المحور لإنتاج بروتين بكتريا B.t والمعلم المنتخب النيومايسين فوسفوترانسفيز (npt II) يجب أن أو هو فعلا تحت مظلة تشريعات وكالة EPA . ينظر لبروتين B.t على أنه مبيد والمعلم nptII كمادة خاملة . يستبعد من تحت سلطة الوكالة النباتات المهندسة وراثيا GMP التى غيرت من التركيب الغذائى والتحمل لمبيدات الحشائش الكيميائية وغيرها من تغييرات طعم وقوام الأغذية . لذلك فان مبيدات الحشائش وغيرها من كيميائيات مكافحة الآفات والتى تستخدم

مع نباتات GMPs سوف تستمر تحت التشريع من قبل وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA.

الاختبارات الحقلية الموسعة فى مساحات أكبر من ١٠ آكر (٤ هكتار) والتى تتضمن المبيدات النباتية تتطلب بضرورة الحصول على موافقة وكالة EPA على التجريب فى هذا المستوى (EUP) . البيانات المطلوبة للحصول على موافقة EUP ترتبط بنوع الطلب المقدم . يمكن إجراء التجارب تحت مفهوم " تحطيم المحصول Crop destruct " إذا كان الاختبار بهدف التجريب فقط والمنتج لن يصل بأى حال من الأحوال الى المستوى التجارى . أما إذا كان المنتج سوف يسوق تجاريا يجب تقديم ما يفيد بالسماح المؤقت أو الكامل أو الاعفاء المؤقت أو الكامل من متطلبات السماح . عندما تؤخذ الوثيقة من EUP تقوم وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA باستعراض الاستخدامات على ضوء التأثيرات المعاكسة الخطيرة على البيئة . المعلومات المطلوبة للحصول على الموافقة والتصريح من قبل EPU .

١-المبررات العقلانية التى تشمل المنتج المقصود وتوضيح أسباب الرغبة فى إجراء الاختبار .

٢-وصف كامل للنبات ومرتبته التقسيمية وغيرها .

٣-البيولوجيا الجزيئية والكيمياء الحيوية الجزيئية والتعبير عن البروتين الجديد وتوصيف الجين وأصل الكائن المأخوذ منه .

٤-الناقل وطريقة التحول .

٥-حجم الاختبار واحتياطات الأمان وحركة المواد

٦-احتياجات آمان أخرى مثل التخزين والتداول وطرق التخلص من النباتات المتحورة .

بمجرد رضى وقبول وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA من أن النبات المبيد لايسبب أية أضرار معاكسة معنوية على البيئة يتم إصدار وثيقة التصريح فى الحال . على غرار USPA , FDA قامت الوكالة EPA بإصدار دلائل للتشريع الخاص ببعض النباتات المهندسة وراثيا والتى يطلق عليها المبيدات من النباتات . تعتقد الوكالة ان غالبية المبيدات من النباتات عندها المقدرة الدنيا لإحداث تأثيرات عكسية غير محتملة على الإنسان والبيئة . هذا المقترح يوضح موقف وكالة EPA لتنظيم وتشريع التعامل مع المبيدات النباتية ذات الأخطار الكبيرة . هذه تشمل مواصفتان عامتان :

١-اقتدار عالى لإحداث تعرض عالى متميز للكائنات غير المستهدفة .

٢-بسبب تقنية الفعل فان لها مقدرة عالية للأضرار بالكائنات غير المستهدفة .

الاهتمامات تتركز على التشريع على المكونات الناتجة بواسطة النباتات التى لها طريقة إحداث فعل سامة وتخلق تعرض جديد للكائنات الدقيقة غير المستهدفة . المكونات المتطابقة داخل الجنس النباتى لا تحتاج لتشريع جديد . الدلائل الخاصة بها لا تتطلب التشريع للنباتات التى يكون فعلها الوقائى لحماية النباتات من خلال التقنيات التى تتضمن حواجز طبيعية مثل الكيوتيكل والتعبير عن المكونات الطبيعية الموجودة فعلا فى النوع فى مستويات مقارنة . فى حالة النباتات المهندسة وراثيا التى تعبر عن بروتينات غلاف الفيروس فان وكالة حماية البيئة الأمريكية عندها قناعة وارتياح من إنه لن يحدث تعرض جديد أو مخاطر جديدة (وكالة حماية البيئة الأمريكية – إصدار عام ١٩٩٢) .

الدول الأخرى

هناك إحساس وشعور فى المجتمع الأوربى بالحاجة الى التنظيم فى مجال سياسة إدارة المخاطر المرتبطة بالاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs . لقد اتخذت خطوة إيجابية عندما تم نشر المركز الذى يدير نشر الكائنات الحية المهندسة وراثيا فى البيئة (EEC ، ١٩٩٠) والتى تشمل GMPs . يقوم هذا المركز بطلب خطوات مرجعية موحدة بين الدول الأوربية . هذا يعنى أن الدول الأوربية سوف تطلب نفس المعلومات لتعضيد النشر المقترح لهذه النباتات . هذه المطالب ستكون فى واحدة من استمارتين بناء على الطرق من الاختبار . الأولى عبارة عن طلب تجريب والثانية ، خاصة بالاستخدام التجارى . لقد أتفق على النشر بغرض التجريب سيكون محدوداً وفى نطاق صغير وتحت السيطرة والإدارة مع أقل قدر من المخاطر وبدون أية إصدارات تجارية لذلك فان الموافقة على هذا النشر تشمل ضرورة تقديم دوسيه كامل للدولة التى سيجرى فيها الاختبار . السلطات المسئولة فى الدولة التى سيجرى فيها التجارب سوف تقوم بتوزيع الدوسية على كل دول الاتحاد الأوربى للنصح وإبداء الرأى ولكن السلطات المخولة فى الدولة هى التى ستقوم باتخاذ القرار ووضع الحكم النهائى عن نشر هذه النباتات المهندسة وراثيا . بسبب أن الإصدارات التجارية تكون مصاحبة للنشر التجارى فان نفس العملية الابتدائية للتصريح بالتجريب ونشرة واجبة الإجراء ولو أن القرار النهائى من سلطة اللجنة المنسقة للاتحاد الأوربى . الثقة والاعتماد الأول على مدخلات السلطات الخاصة بالتجريب والتى تقوم بتقييم المخاطر على أسس علمية فان اللجنة التنسيقية تتطلع الى المصداقية والعقلانية . فى حالة تذبذب وعدم وضوح رؤية وقرار السلطات الأولى المنوطة بالموافقة على التجريب

فان القرار النهائى يصبح مسئولية اللجنة الاستشارية للاتحاد الأوربى والتى يجب أن تستند لتفصيلات من الأسس العلمية تعضد القرار . بعد استلام طلب التجريب يكون أمام اللجنة ٩٠ يوما للقبول أو طلب معلومات إضافية عن نشر التجريب . فى حالة النشر التجارى يضاف ٣ شهور أخرى للجنة الاستشارية لاستكمال الدراسة المتأنية للدوسيهات والوصول الى اتفاق . هناك اتفاق عام بين كل دول الاتحاد الأوربى حول سياسة نشر النباتات المهندسة وراثيا على مستوى دول السوق .

اليابان من الدول التى تتخذ حيطة كاملة نحو تنظيم وتشريع الاختبارات الحقلية ويبدو أنها تأخرت في تطور السياسة التشريعية الخاصة بتجريب ونشر النباتات المهندسة وراثيا . فى الوقت الحالي يتطلب الحصول على الموافقة على إجراء الاختبارات الحقلية فى اليابان توفر بيانات كاملة من دراسة شاملة فى حجم النمو ويتبعها تجارب الصوب الزجاجية. يجب أن تجرى هذه التجارب فى اليابان كما يجب أن تقدم البيانات وتراجع قبل اتخاذ اى قرار خاص بالنشر الميدانى الحقلى وبعناية . الاختبار الحقلى الأول يتطلب أن تكون القطع التجريبية كاملة الزراعة لتقليل المخاطر البيئية . مع تعليق نتائج هذا الاختبار قد يتوجه أحد الطالبين للحصول على موافقة لإجراء مزيد من النشر التقليدى للنباتات المحورة وراثيا . اليابانيين يقومون فى الوقت الراهن بوضع مسودة دلائل لأنهم على دراية كاملة بالمنتجات التى ستصبح متاحة من خلال الهندسة الوراثية وهى GMPs كما أنهم لايريدون خلق آية حواجز تجارية مع الدول المصدرة .

النواحى البيئية Environmental aspects

التوجه نحو قبول الاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs يختلف ويتفاوت . من المناقشة التى ذكرت قبلا يتضح أنه بينما تختلف التوجهات إلا أن أنواع الأسئلة والأساس العلمى لاتخاذ القرارات متضمنة الإجابة عن نفس الأسئلة الأساسية . فى كل الوثائق التى تعضد GMPs تتم مناقشة ثلاثة نواحى :

١-العقلانية فى تطوير المنتج وإجراء الاختبار والفوائد المرجوة .

٢-التأثيرات البيئية .

٣-التأثير على أمان الإنسان والحيوان .

للحكم على التأثيرات البيئية للنباتات المهندسة وراثيا يجرى تقييم بيئى والذى يتطلب معلومات :

١-حركة الجينات (انتشار اللقاح وكفاءة العبور الخارجى) .

٢-الصفة وتأثيرها على ايكولوجية النبات (التأثير على اللياقة فى البيئة ، كفـاءة وقدرة الغزو والمقدرة الحشائشية) وكذلك التأثيرات الثانوية والتى تعرف علـى أنها تأثيرات غير ممكن التنبؤ بها على الهندسة الوراثية مثل مستويات تغيـير نواتج التمثيل (الممثلات) الثانوية .

٣-أمان منتجات الجين تجاه الكائنات غير المستهدفة واستخداماتها .

٤-مقدرة وعظم المشاكل البيئية غير المرغوبة فيها (حركة الجيـن مـن خـلال تقنيات أخرى بخلاف التقنيات داخل النوع) .

سوف نتناول فى هذا المقام التركيز علي النواحي البيئيـة لنوعيـن مـن النباتـات المهندسة وراثيا والتى أختبرت على امتداد سنوات عديدة فى الحقل وفى مناطق متعـددة . الأول هو القطن المقاوم للحشرات (IRC) والثانى هو الكانولا (لفت الشلجم) الذى يتحمل مبيد الحشائش جليفوسات أى الكانولا المقاوم للجليفوسـلت (GTC Canola) . مـع كـل مناقشة سوف نستعرض مخاطر التجارب الحقلية وكذلك الفوائد فى محاولة لعمل ميزان فـى أى تقييم بيئى .

قبل مناقشة هذين المثالين يجب التذكرة بثلاثة موضوعات ترتبـط بشـكل واسـع بالنواحى البيئية للنباتات المهندسة وراثيا . الأول يتمثل فى إمكانية نقل هذه الجينات خـلال الأحياء بشكل عشوائى وما بين الأنواع مما يثير نوعان من الانتقادات . بينما هناك إمكانيـة خلال التطور فان اتجاه حركة الجين يمكن أن تحدث فان كل الأدلة تشير أن حركة الجينات من النباتات الى الكائنات الدقيقة أو للأنواع غير المرتبطـة بالنباتـات محتملـة الحـدوث (Goodman and Newell ، ١٩٨٥) . العديد من الأمثلة عن إنسياب الجين حتـى بيـن الأنواع المتوافقة يمكن أن تفسر من خلال التطور المتقارب . هذه الحركة العشوائية للجيـن تظل مثيرة للاستطلاع حتى يمكن إثبات شيء مخالف من التجريـب . الثـانى أن معظـم التغيرات الوراثية تقلل أكثر منها تزيـد مـن اللياقـة (Crawley ، ١٩٩٢) . الأنـواع والطرز الوراثية البرية عادة تكون أكثر لياقة وتكون منافسات قوية وكذلـك تكـون أكـثر حشائشية . حيث أن معظم التغيرات الوراثية تسوى النبات تحت بعـض النواحـى البيئيـة المؤثرة فانه لا يتوقع أن النباتات المهندسة وراثيا GMP سيكون لها اقتدار كبير كأن تكـون آفة عنه كصنف تجارى يمكن الحصول عليه من خلال التربية التقليدية والانتخـاب . فـى النهاية لا يوجد أى دليل على الإطلاق من أن الثبرات التاجية المشتقة من الأجروبـاكتيريوم تومى فيسيانس عديمـة الأذرع التـى تعـول التحـولات (Irc aand GT Canola) (Huttrer وآخرون ، ١٩٩٢) . هذا يوضح أن الكائن يقل بدرجـة كبـيرة فـى مـزارع الأنسجة ولا يتضاعف فى البذور .

القطن المقاوم للحشرات Insect Resistance Cotton (IRC)

يوجد العديد من الدراسات المرجعية المتاحة عن المراتب التقسيمية والنواحى الوراثية وطريقة التكاثر والاقتدار العبورى الخارجى للقطن . الأقطان المزروعة تجاريا (جى – هيرسوتم ، جى – باربارينس) وهى الليلية رباعية الصبغات لا تستطيع العبور الخارجى Outcross الى صنفى القطن الأقارب البرية والتى تحدث فى الصنف الأمريكى G.thurberi فى أسيزونا والصنف G.tomentosum فى هاواى . بالإضافة الى ذلك فان الصنف G.tomentosum غير متوافق مورفولوجيا ووقتيا مع الأصناف التجارية للأقطان. البيانات تعضد وبقوة عدم وجود تقنية واضحة للعبور الخارجى لجينات القطن المقاوم للحشرات IPC فى الأصناف الأقارب البرية . الصفات الحشائشية قبلت على أنها صفات متعددة الجينات (Keeler ، ١٩٨٩) . اسهامات البذور مثل الكمية والانتشار والسكون وطول الثبات فى التربة وسهولة الإنبات كلها لا تمثل خصائص للقطن . العكس تم تعضيده من خلال الحقيقة أن القطن ذات نمو خضرى بطىء مع طول فترة حياة عما هو الحال مع الحشائشية . من جهة أخرى هناك أدلة ان القطن المقاوم للحشرات قد يكون أكثر تنافسية عن الأقطان غير المحورة بسبب المقاومة للاضرار التى تحدثها الحشرات . هذه الصفة لا يتوقع منها أن تزيد الحشائشية كما ذكر فى السابق من أن القطن لا ينجح فى النمو فى مناطق عديدة كما أن العبور الخارجى للحشائش الأقارب لا يمثل إمكانية معقولة للحدوث كما أن القطن لا يعتبر ممثل لأى مشكلة حشائشية فى المحاصيل الأخرى .

التأثيرات الثانوية للهندسة الوراثية تم تقييمها ووجد أن النباتات المقاومة للحشرات لاتتغير بالنسبة لنباتات المقارنة فى اتجاه المكونات الطبيعية مثل الجوسيبول الذى يعبر عنه فى الأوراق . التغير فى مستويات هذه المكونات قد يؤثر على حساسية نباتات IRC للآفات بالإضافة الى ذلك فان المشاهدات الحقلية لم توضح أية اختلافات فى الحساسية للأمراض الفطرية والفيروسية الشائعة . من الفوائد المثيرة للاهتمام لهذه التكنولوجيا النقص فى مستويات الأفلاتوكسينات من جراء التتابع فى مكافحة دودة اللوز القرنفلية وهى واحدة من الحشرات المستهدفة والتى تعتبر أقل لفطر أسبرجيلليس فلافيس .

لقد أمكن تحوير نباتات القطن للتعبير الجيد عن بروتين بكتريا باسيلليس ثورينجنسيز من تحت النوع كورستاكى (B.t.k.) وهو متخصص فى مكافحة الآفات التابعة لرتبة حرشفية الأجنحة مثل ديدان اللوز ودودة ورق القطن . لقد اتضح أن البروتين يعبر فى النبات والذى يوجد فى المستحضر التجارى ديبيل لا يفرقان بناء على التخصصية والاختيارية (Fuchs وآخرون ، ١٩٩٣) . على غرار الديبيل فان نباتات القطن المقاومة

للحشرات لا تضر بالحشرات النافعة ولم تظهر تأثيرات سالبة فى دراسات التغذية على كلا البروتين النقى (بالأنبوب المغذى) أو بذور IRC أو الدقيق الموضوع فى الغـذاء . لقـد اجريت تجارب كذلك عندما يضاف البروتين الموجود فى مسحوق النبات الى التربة كما تـم قياس الانهيار من خلال تقدير نصف فترة الحياة القيم التى تحصل عليها كانت مقارنة لمـا هو منشور عن المستحضر الميكروبى والتى أوضحت أن ناتج الجين لا يثبت فى الأرض . على عكس الديبيل فان IRC تقدم فائدة تحقيق المكافحة لمدة طويلة فى الموسم دون حاجـة لتكرار المعاملات ومن ثم تقلل من استخدام المبيدات الحشرية . لقد تأكد أن هـذه الوسـيلة مفيدة وتتواءم مع الإدارة المتكاملة للآفات (IMP) . لقد قدمت بيانات IRC لوكالة حمايـة البيئة الأمريكية للحصول على موافقة EVP (Federal Register – ١٩٩١) .

الكانولا المهندسة وراثيا GT canola

الكانولا اسم تجارى مسجل فى كندا وهو يشير الى أصناف لفت الشلجم ومكوناتـها المجهزة والتى تقابل المواصفات القياسية من حيث المستويات القليلة من حامض الايورسيك erucic والجلوكوسينولات . هناك فردين أو عضوين مـن عائلـة Brassica (B.napus ويطلق عليه الشلجم الأرجنتينى و B.camjaegtris ويطلق عليه الشلجم البولندى مزروعين فى كندا منذ الأربعينيات لإنتاج الزيت حيث أن الكسب الخالى من الدهن يسـتخدم كعلـف حيواني وسماد . النوع الثالث B.Juncca تم تهجينه فى خطوط إنتاج مع مستويات مقبولـة من حامض اليورسيك والجلوكوسينولات . بوجه خاص اشتقت الكـانولا مـن B.napus الصنف ويستار . العديد من أنواع Brassica تنمو فى مدى واسع من الظروف الجغرافيـة والتى تمتد عبر أوربا وكندا من وسط أونتاريو حتـى شـمال غـرب البرتـا (Downey وآخرون ، ١٩٩١) وقد تعرضت لعدد وفير من التجارب التى صممت لتقييم كفـاءة نقـل الجين ما بين الحشائش الهامة والأنواع التى تشترك فى إنتاج الكانولا . العبور والتهجين مـا بين الأنواع التى تحدث طبيعيا أو تحت السيطرة أجريت بين أربعة أنواع مـن البراسـيكا (نابس ، كامبستيرس ، جونكيا ، النوع الحشائشى فيجـرا) والنـوع سـينابس أرفينسـيز (B.Kaber) . النوع الأخير كان ذات أهمية خاصة لأن خردل برى يميز ويعرف على أنه حشيشة تمثل مشكلة فى الكانولا . عندما يتـم العبـور المتبـادل بيـن S.arvensis مـع B.napus و B.campestris تحت الظروف النموذجية لا يحصل على تقاوى هجين . من الأمور على نفس درجة الإثارة إنتاج بذرة واحدة بعد العبور الرجعى الـذى أجـرى عـام ١٩٨١ للصنف S.arvensis وكان النبات الناتج عقيما . عندما أجرى العبور المتبادل مـع B.juncea و S.arvervis تم الحصول على ٢,٥ بذور هجين لكل ١٠٠ برعم تم تلقيحـه

أما العبور بين s.arvensis و B.juncea لم ينتج بذور هجين . لقد أشار البحاث أن نقـــل الجين من الأنواع النباتية الكبرى نابوس ، كامبستيرين ، جيانكيا الى S.arvensis لم يتحقق حتى مع أنسب الظروف ولم يتم التعرف على أى هجين من العبور الطبيعى لهذه الأنـــواع عندما زرعت مرافقة فى الحقل فى نفس القطع التجريبيـــة لمـــدة ثلاثـــة ســـنوات متتاليـــة (Downey وآخرون ، ١٩٩١) .

هناك إمكانية لحدوث تقنيـــة عبوريـــة bridging mechanism . العبـــور مـــن B.Juncea الى B.nigra وجد أنه يصل الى ٠,٥% تحت الظروف المتحكم فيها . أيضـــا تحت هذه الظروف تم تحديد إمكانية عبور Bnigra الى S. arvensis وقد وجد أن التوافق وصل الى ٧% . هذا يثير الاهتمام الى إمكانية حدوث العبور الخارجى بشـــكل معـــادلات رياضية . عند ملاحظة ١٥٠ نبات B.nigra تحت الظروف الطبيعية لم يحصل البـــاحث Downey على أى دليل يفيد بإنتاج هجين مع B.Junceu . إذا أخـــذ فـــى الاعتبـــار أن B.nigra لم توجد بشكل تقليدى فى المساحات المزروعة كما أنها غير موزعة بشكل واسع فى معظم مناطق إنتاج الكانولا يكون من العقلانية استنتاج أن إمكانيـــات حـــدوث العبـــور الخارجى بالضرورة تساوى صفر . لقد خلص داونى وأعوانه من نتائج التجارب الـــى " ان التجارب الخاصة بالعبور الطبيعى والمتحكم فيه أنه بالرغم من أن نقل الجين بين أصنـــاف البراسيكا تحت الظروف الطبيعية يمكن حدوثه إلا أن الحواجز التى تعترض انسياب هـــذا الجين الى الأنواع الحشائشية B.nigra ، S.arvtrsis مرعـــب وهـــائل وقـــد لا يحـــدث (Downey وآخرون ، ١٩٩١) .

لقد درس دوانى كذلك حركة حبوب اللقاح من B.rapa , B.napus تحت الظروف الطبيعية والصناعية على امتداد سنتان . باستخدام طفرة متنحية فى سلالة كدليل تمكن مـــن تحديد العبور الخارجى على أنه وظيفة المسافة . أظـــهرت النتـــائج أن B.napus تعـــبر خارجيا بنسبة ٢,١ ، ١,١ ، ٠,٦% مع مسافات ١٣٧,٤٦ ، ٣٦٦ مترا على التوالى بينمـــا عدم التوافق الذاتى للصنف B.rapa لوحظ بنسب ٨,٥ ، ٥,٨ ، ٣,٧% مع نفس المسافات. لقد أوضحت النتائج أن الرياح لا تلعب دور مؤثر فى نقل حبوب اللقاح من أنواع البراسيكا. هذه الحقائق مع الأدلة الأخرى الخاصة بمعلومات التوافق الخلطى بين الأنـــواع عضـــدت مفهوم أن هذه الصفات لا يسهل نقلها الى الأقارب الحشائشية وكذلك لا تمثل خطورة كبـيرة على البيئة . حركة حبوب اللقاح الأصناف الشلجم المقاومة لمبيدات الحشائش وغيرها مـــن النباتات المهندسة وراثيا تمثل معلومات هامة جدا فى هذا المجال .

النقطة الثانية التى يجدر الإشارة اليها فى مجال التقييم البيئى تتمثل فى ما إذا كـانت الصفة المرغوبة سوف تحقق ميزة خاصة لنبات أو ستثير الاهتمام نحـو خلـق مشـاكل حشائشية . أظهرت النتائج التى تحصل عليها Crawley وآخرون (١٩٩٣) حديثـا عـدم وجود دليل على أن الشلجم يستطيع غزو الأماكن الطبيعية التى لم يحدث فيها خلـل كمـا لايوجد دليل على أن الخطوط النباتية المهندسة وراثيا من الشلجم أكثر عنفا وغزوا أو أكـثر ثباتا فى الأماكن المختلفة عما هو الحال مع أقرانها . مؤلف الكتاب يقول أن هذا الكلام غير دقيق ويجب التعامل مع مخاطر الصفات الأخرى من منطلق الحالـة بحالتـها Case by case .

من وجهة نظر مستقبلية ومنظور العمليات الزراعية فان الكانولا حساسة للعديد مـن مبيدات الحشائش المسجلة . العمليات الجارية تعنى بالتخلص من الأنواع الغريبة من حقـول القمح والشعير من خلال دورات متتابعة من معـاملات ٤,٢-د . وجـود صفـة التحمـل للجليفوسات سوف لا تتداخل مع العمليات الجارية فى مكافحة الحشائش . مـن التـأثيرات الثانوية للكانولا المهندسة وراثيا ما أشير من جراء دراسة تأثير المنطقة وتحليل الأحمـاض الأمينية وقياس مستويات الجلوكوسينولات وتكوين الحامض الدهني . أظهرت النتائج حتـى الآن أن النباتات المهندسة وراثيا متكافئة مع الصنف التجارى Westar . مازلنا فى حاجـة الى مزيد من الدراسات المستفيضة للتأكد من أمان الجين والمنتجات المتحولة .

الفصل الثالث
تشريعات الآمان الحيوى فى مصر

عندما تناولت التشريعات الخاصة بالنباتات المهندسة وراثيا والكائنات الدقيقة كذلك فى الدول المتقدمة وأهمية الأمان الحيوى كان لا بد أن أبحث عن هذا الأمان فى مصر لأننا مهيئين تماما ومستهدفين لدخول هذه التكنولوجيا الجديدة من الخارج أو من معاملنا الى الزراعة المصرية والبيئة المصرية . لذلك توجهت الى أخى وصديقى العزيز أ٠د٠ مجدى مدكور مدير معهد بحوث الهندسة الوراثية الزراعية بمركز البحوث الزراعية التابع لوزارة الزراعة أساله العون والمشورة . لقد تفضل سيادته بإعطائي نسخة من نظام ومحددات وتشريعات " تأسيس نظام قومى للأمان الحيوى فى مصر : الإرشادات والأنظمة " والذى تم إعداده عام ١٩٩٤ . سوف أضع هذا الإصدار كما هو دون تعليق حتى يتأكد القارىء الكريم أننا نتواكب مع متطلبات الأمان على نفس المستوى إن لم يكن أفضل من الدول المتقدمة .

تمهيد :

تحتل تطبيقات التقنية الحيوية موقعا متميزا فى التوسع العلمى الكبير خلال هذا العقد. ولما كان إنتاج وانتشار نواتج الكائنات الحية المعاملة بالهندسة الوراثية قد أثار احتمال تعرض الإنسان والبيئة للمخاطر لهذا كان يتعين أن تجرى كافة بحوث التقنية الحيوية في إطار ضوابط منظمة للأمان الحيوى .

وتعنى هذه الوثيقة بإنشاء نظام قومى للأمان الحيوى فى مصر بهدف تقديم دليل لمساعدة صانعى السياسات فى إنشاء أنسب نظام قومى للأمان الحيوى حيث لا يتوفر هيكل يلائم هذا النظام حاليا . وقد تم إعداد الهيكل المقترح للنظام القومى ويتضمن المرفقات الإرشادات الخاصة بالأمان الحيوى بعد تطويرها بمعرفة المنظمات العالمية المتخصصة .

إن إقامة مثل هذا النظام سوف يؤكد استمرار التقنية الحيوية فى أمان دون تعريض العاملين والمجتمع والبيئة لأية مخاطر محتملة .

مقدمة :

المقصود بالتقنية الحيوية أى تقنية تستخدم الكائنات الحية أو مستخرجاتها فى تطوير أو تحسين إنتاج المحاصيل والأغذية والأدوية ومستلزمات الرعاية الصحية والأمصال والصناعات الكيماوية ومنتجاتها كماً ونوعاً وتتدرج هذه التقنيات بين التقنيات الحيوية

التقليدية واسعة الانتشار والتقنيات الحديثة التى تعتمد على طريقة إندماج الحامض النووى الديوكسى ريبوزى المعاد تجميعه (r- DNA) والتى تعرف بالهندسة الوراثية . وتتضمن أغراض استخدام نواتج الكائنات الحية الدقيقة المطورة وراثيا للسيطرة على الأمراض ومبيدات الحشائش فى الزراعة وإنتاج اللقاحات وتطهير النفايات من الكيماويات السامة والترشيح الميكروبى للخامات المعدنية وتحسين استخلاص الزيوت البترولية . وتكتسب النباتات المعاملة بالهندسة الوراثية عدة مزايا منها زيادة المقاومة للأمراض ومبيدات الحشائش ، تحمل الجفاف والظروف البيئية الأخرى الغير ملائمة ، تقليل الفاقد من المواد الغذائية أثناء التخزين والنقل وزيادة القيمة الغذائية للمنتجات الغذائية .

الأمان الحيوى

يستخدم هذا المصطلح فى شرح السياسات والطرق المتبعة فى تأمين التطبيقات الآمنة للبيئة للتقنيات الحيوية الحديثة . ويكتسب سعة الانتشار بقدر ما تسعى كثير من الدول للإفادة من التطبيقات العلمية الحديثة فى الزراعة والطب والبيئة دون أن تتعرض الصحة العامة والأمان البيئى للخطر .

وقد أسست العديد من الدول الصناعية الأنظمة الخاصة بقواعد التقنية الحديثة ، كما قامت اللجنة الاستشارية r-DNA (الحامض النووى الديوكسى ريبوزى) بمعهد الصحة القومى (NIH) بتطوير أساليب اختبار وتقييم الأمان للتجارب المقترحة ونشرت إرشادات مكثفة للشروط التى يقتضى عند إجراء نماذج من التجارب المتنوعة . وتقتصر إرشادات معهد الصحة القومى على الاستخدام المعملى لمادة r-DNA دون إطلاق الكائنات المعاملة وراثيا الى البيئة ويتضمن المرفق رقم "١" إرشادات معهد الصحة القومى .

ولما كان اختبار الحامض النووى الديوكسى ريبوزى المعامل بالهندسة الوراثية يجب أن يجرى خارج العمل فهناك طريقة تعرف بالإطلاق المتأنى Deliberate أو الإدخال المخطط Planned introduction لإدخال هذه الكائنات المعاملة فى البيئة مما قد تنشأ عنه بعض المخاطر المصاحبة لتمرير هذه الكائنات المعاملة بالهندسة الوراثية .

أسئلة تتعلق بالتعريف بالأخطار التى تنشأ عن إطلاق الكائنات الحية الدقيقة فى البيئة :

- هل يمكن ان ينشأ مصادفة عن استخدام تكنولوجيا r-DNA أمراض وبائية جديدة للنبات ؟ .

- هل يقود استخدام r-DNA الى تحويل الكائن غير المرضى الى كائن ممرض بمحض الصدفة ؟ .
- هل من الممكن انتشار الجين المستحدث فى الأوساط الميكروبية ؟
- هل هناك تأثير للكائنات الحية الدقيقة المعاملة بالـ r-DNA على إحداث تغير بالتجمع الميكروبى للتربة ؟

حددت الأكاديمية القومية الأمريكية للعلوم (NAS) المخاطر الناتجة عن إطلاق الكائنات المعدلة بالهندسة الوراثية فيما يلى :

- ليست هناك أية شواهد تنبىء عن وجود خطر واحد سواء من استخدام تقنيات r-DNA أو من نقل الجينات بين كائنات متباينة .
- تتماثل المخاطر المصاحبة لإدخال الكائنات المعاملة بالهندسة الوراثية من حيث النوع – بتلك المصاحبة لإدخال كائنات غير مطورة أو الكائنات المطورة بطرق أخرى .

وفى خطوة لاحقة دعت منظمة الأمم المتحدة للتنمية الصناعية (UNIDO) الى عقد اجتماع لمجموعة من الخبراء بفيينا فى مارس ١٩٩١ ضم عشرين خبيراً يمثلون النواحى الأكاديمية والصناعية والحكومات من الدول النامية والمتقدمة والمنظمات الدولية لإعداد مسودة دستور (أو مجموعة مبادىء) تحكم التداول الآمن واستخدام وإطلاق الكائنات الحية المعدلة التركيب الوراثى فى البيئة وذلك فى محاولة لإيجاد تجانس بين الإرشادات القائمة واقتباس الحد الأدنى من المبادىء المقبولة على المستوى العام وتقديم إطار عمل دولى فى صورة مجموعة مبادىء لإطلاق الكائنات الحية المعاملة بالهندسة الوراثية ، وذلك بهدف إقامة الحد المقبول من التعاون الدولى اللازم .

وقد عنى بان تكون هذه الإرشادات التى تم التعبير عنها فى هذا الكود صديقاً للمستخدم بغرض : تنشيط مراحل التقنية الحيوية وتقدمها والتى يمكن تطويريها أو إمتدادها لتتلائم مع حالات بعينها تبعا لرغبة كل دولة ويتضمن المرفق رقم (٢) الـ Code of conduct هذا الكود .

ولقد وجهت الدول النامية أيضا بالطلب المتزايد على إدخال أبحاث الحامض النووى الديوكسى ريبوزى المعاد تجميعه r-DNA ونتيجة للحاجة العاجلة للمجتمع العلمى لتوفير المشورة لكل من الباحثين والمنظمين فى مجال تقييم المخاطر المصاحبة للتقنية الحيوية .

لهذا يتعين إنشاء نظام قومى للأمان الحيوى فى إطار التنظيم القائم والمعاهد العلمية المتوفرة والأفراد والتشريعات الحالية بأكبر قدر مستطاع بحيث يقدم الآليات المناسبة لكل من التطبيقات المحتواه وغير المحتواه بما يضمن أمان المنتجات المستخدم فيها أساليب التقنية الحيوية مثلما هو الحال باستخدام التقنية الحيوية التقليدية .

هذا ويتطلب إعداد سياسة قومية لقواعد أبحاث الى r-DNA فى الدول النامية توفر العناصر التالية :

١- إيجاد هيكل قومى تنظيمى مع توفر الدعم المالى ، ويتألف الهيكل التنظيمى من:

أ – لجان الأمان الحيوى التى تتكون منها السلطة التنظيمية .

ب–مجموعة من التشريعات الخاصة بالأمان الحيوى والقواعد والإرشادات التى يجب اتباعها .

٢- اتاحة التمويل والخبرات العلمية والفنية المناسبة لتحليل قيم المخاطر وأشكالها .

٣- التنسيق مع المنظمات الدولية .

٤- تحديد آلية لتجميع المعلومات الخاصة بالظروف الزراعية والبيئية المحلية .

٥- أنظمة لمتابعة تطور التقنية الحيوية التى قد تؤثر على صحة العاملين وسلامتهم.

٦- توفر الثقة فى خبرة صانعى القرار .

٧- أنظمة لتوفير المعلومات والتوعية اللازمة للجمهور .

تقدم هذه الوثيقة مقترحات خاصة للسياسات والإجراءات التى قد ترغب السلطات الوطنية فى الأخذ بها عند إنشاء نظام الأمان الحيوى ، كما تتضمن اقتراح هيكل تنظيمى وأمثلة لطرق تقييم المخاطر والإرشادات الملائمة للبيئة المصرية .

ومرفق طيه المستويات المقبولة دوليا لمجموعة المبادىء مع تقديم أمثلة للبحث مقيمة فى إطار الإرشادات . ومما يجدر ذكره أن جميع هذه البنود تقدم وتناقش كأمثلة لخطة متناسقة لنظام الأمان الحيوى . كما أنه من الأهمية بمكان الإشارة الى ان هذا العرض عكس مختارات بسيطة من العدد الكبير من الآليات المستخدمة دوليا على نطاق واسع لأغراض الأمان الحيوى .

وختاماً تجدر الإشارة الى أن المخاطر التى قد تتعرض لها صحة الإنسان والبيئة لاتقتصر على التقنية الحيوية بوجه خاص ، بل أن هذه الأسئلة قد طرحت كعنصر هام فى

مجال تقنية وتنظيم والارتفاع بمستوى المنتجات باستخدام أكثر من التقنيات القديمة والحديثة مثل الكيماويات والمستحضرات الدوائية .

تعريفات

البيئة المتاحة (المتقبلة) : تعزى الى تلك البيئة التى فى إمكان الكائن الحى ونتاجه الوصول إليها إذا أدخل الى مكان البحث .

الآمان الحيوى : يعزى الى السياسات والطرق المجهزة لكي تضمن التطبيق الأمني البيئي على التكنولوجيا الحيوية .

الحصر (الاقتصار) : يعزى الى حجز أو تقليل انتشار أو بقاء الكائن الحي أو منتجاته فى البحث الشامل على إدخال هذه الكائنات الحية الى البيئة .

الإمكانيات المتاحة : تعزى الى المباني (مثل المعامل والصوب) التى تحيط بالكائن الحى وتمنعه أو تحد من حركته خارج البناء .

الكائن الحى المغير (المحور) وراثيا : يعرف علميا بأنه ذلك الكائن الحي الذى عدلت صفاته الوراثية بواسطة التدخل البشرى باستخدام أي طريقة تؤدى الى إدخال أو إعادة ترتيب أو انتقال المادة الوراثية من جينات الكائن الحى .

النظام البيئي الطبيعي أو المدبر : تعزى الى النبات والحيوان والكائنات الحية الدقيقة وتفاعلاتها فى البيئة الداخلية والبرية .

الكائن الحى : هو أى كينونة حيوية سواء كانت خلوية أو لا خلوية مع قدرته على البقاء ذاتيا واستجابته لعوامل وقوة تطور .

الكائن الحى الأصيل (الابوى) : يعزى الى الكائن الحى الأول الذى يصبح مستقبلا لإدخال المادة الوراثية أو الجين الخاص به يصبح متغيرا عن طريق إزالة أو إعادة ترتيب مادته الوراثية .

المشروع البحثى المخطط للإدخال فى البيئة : يعزى الى المشروع البحثى خارج الأماكن المخصصة فى مكان مصمم مع تقييد ملائم المهندس وراثيا للكائن الحى الى البيئة r-DNA .

تقييم المخاطر : يعزى الى تقييم المخاطر من إدخال والإنسان ونظام التدبر الطبيعى أو المروض .

المصطلحات

ABRAC	اللجة الاستشارية لبحوث الهندسة الوراثية الزراعية
APHIS	خدمات فحص صحة الحيوان والنبات
BSO	موظف (قائد) الأمان الحيوى
EA	التقييم البيئى
FONSI	البحث عن أثر غير هام
GEOS	كائنات حية مهندسة وراثيا
GMOS	كائنات حية معدلة وراثيا
IBC	لجنة الأمان الحيوى
LSC	معدل الأهمية الأمنية
NAS	الأكاديمية العلمية الدولية
NBC	اللجنة القومية للأمان الحيوى
NBIAP	برنامج تقييم الآثر الحيوى الدولى
NIB	معاهد الصحة الدولية
PI	المسئول (المفتش) الرئيسى
UNIDO	منظمة الأمم المتحدة للتنمية الصناعية
USDA	وزارة الزراعية الأمريكية

أصبحت إقامة نظام قومى للأمان الحيوى ضرورة ملحة نتيجة الزيادة السريعة فى إدخال تطبيقات التقنية الحيوية فى مصر .

إن إقامة منظومة أمان حيويى قومى مع ضمان الالتزام بقواعدها يحقق الآتى :

١-التأكيد عل استمرارية التقنية الحيوية بصورة آمنة دون تعريض العاملين والمجتمع والبيئة لأية آثار ممكن تجنبها .

٢-تسهيل الوصول الى التقنيات الحيوية الحديثة المبتكرة بالخارج حيث أن كثير من المعاهد الدولية والشركات لا تقوم باختبار كائنات حية معاملة بالهندسة الوراثية إلا بعد الموافقة عليها من جهة حكومية مسئولة .

٣-سرعة تقبل المجتمع مع ما يتبعه ذلك من مزيد من التنمية للتقنية الحيوية الحديثة .

المبادئ الأساسية لإعداد سياسة قومية لتنظيم التقنية الحيوية

١-المراجعة الدورية لإبراز الخصائص والمخاطر التى تم التعرف عليها لمنتجات التقنية الحيوية دون الاقتصار على الطريقة التى أحدثتها بصفة أساسية.

٢-يجب أن تكون مراجعة التقنية الحيوية التى يتعين مراجعتها مصممة على أساس معايير الكفاءة والتأثير مع التأكيد على حماية الصحة العامة وأمان البيئة .

٣-يراعى أن تتكامل الاحتياجات التنظيمية للتقنية الحيوية الحديثة فى إطار قواعد المنظومة الشاملة التى تحكم عملية إدخال منتجات جديدة فى القطاع الزراعى.

٤-أن درجة معرفة سلوك الكائنات المثيلة عند إطلاقها فى البيئة يجب أن تحدد مستوى التنظيم المطلوب بحديه الأدنى والأقصى اعتمادا على درجة المخاطر التى تم التعرف عليها .

٥-يتعين أن تكتسب برامج المنظومة المرونة والقدرة على سرعة التكيف مع المعلومات الجديدة والتقدم السريع فى التقنية الحيوية .

الجزء الأول : لجان الأمان الحيوى

إن إنشاء لجنة استشارية قومية للأمان الحيوى يعتبر الخطوة الأولى فى تطوير السياسات الملائمة والإجراءات الخاصة بالتنقية الحيوية ، حيث تقوم هذه اللجنة بسرعة وضع السياسات وتحديد الإجراءات التى تحكم استخدام التقنية الحيوية الحديثة فى البلاد .

١- اللجنة القومية للأمان الحيوى National Biosafety Committee (NBC)

شكلت لجنة مصرية قومية للأمان الحيوية تضم أعضاء من واضعي السياسات والمصممين والخبراء العلميين فى الزراعة والصحة والبيئة من الحكومة والمعاهد الأكاديمية للبحوث .

١-١- مهام ومسئوليات لجنة الأمان الحيوى

الغرض من اللجنة القومية هو وضع السياسات وتحديد الإجراءات التى تحكم التقنية الحيوية الحديثة بالبلاد . ويتضمن ذلك نشر إرشادات اللجنة القومية للأمان الحيوى لاتباعها على المستوى القومى كما تقوم اللجنة أيضا بتقديم النصائح الفنية للسلطات التنظيمية والمعاهد المسئولة عن تنمية التقنية الحيوية فى البلاد .

١-٢- أعضاء اللجنة القومية للأمان الحيوى

حتى يمكن التأكد من توفر الكفاءة اللازمة لوضع سياسات الأمـان الحيـوى علـى المستوى القومي لهذا نوصى بان تضم اللجنة القومية للأمان الحيوى أعضاء ممثلين من كل من وزارات الزراعة والتعليم والصناعة والصحـة وشـئون البيئـة والقطـاع الخـاص واستشاريين فى مجال رسم السياسات والقوانين الوضعية . فضلا عن أعضاء غير فنييـن يمثلون اهتمامات المجتمع المحيط من حيث الصحة وحماية البيئة .

١-٣- أوجه نشاط اللجنة القومية للأمان الحيوى

أ - استنباط وتنفيذ وتحديث مبادىء الأمان : يتعين علـى اللجنـة القيـام بتشـريع الإرشادات لكل من التطبيقات المحتواه وذلك من أجل إقامة سياسة آمنة للبحث بحيث تغطى المعاملات المعملية والبيوت الزجاجية والتجارب الحقليـة المحـدودة وكذلـك الاسـتعمال التجارى ، على أن تتضمن الإرشادات الخاصة بالبحوث التى تجرى على الكائنات الطبيعية الدخيلة على البلد المضيف .

ب- تقييم المخاطر وإصدار التراخيص : تقوم اللجنة بمراجعة الطلبـات الحديثـة لتقييم الفوائد المرجوه والمخاطر الكامنة من تأثير إجراء البحث باستخدام الكائنات المطـورة وراثيا على البيئة والمجتمع الإنسانى . وفى حالة إصدار ترخيص ما بعد إجـراء تحليـل المخاطر المحتملة فعلى اللجنة إجراء مراجعة دورية لمقاييس الأمان المتبعة وذلك للتأكد من اتباع إرشادات الأمان الكافية .

ج- التنسيق مع المنظمات الدولية والقومية : تقوم اللجنة القومية للأمـان الحيـوى بالاتصال بالمنظمات الدولية والقومية واستمرارية إجراء هذه الاتصالات مـع الأخـذ فـى الاعتبار ما يستحدث من معلومات علمية أو فنية هذا مع متابعة التغيرات التى قد تطرأ على إصدارات حقوق الملكية على المستويين القومي والدولي .

د - إتاحة التدريب والاستشارات الفنية : يجب أن تهتم اللجنـة القوميـة للأمـان الحيوى بتوفير التدريب الكافى فى مجال إجراءات الأمان الحيوى وكذلك إتاحة الاستشارات الفنية للجان العلمية للأمان الحيوى .

هـ- تقديم تقرير سنوى (بحد أدنى) للهيئات الحكومية : يقتضـى تقديـم تقريـر سنوى للهيئات الحكومية يغطى كافة أوجه نشاط اللجنة على مدار العام .

١-٤- المفتش العام

تعين اللجنة القومية للأمان الحيوى مفتش عام أو أكثر تنحصر واجباته فيما يلى :

أ – القيام بالتفتيش لتحديد ما إذا كانت المعاهد تلتزم بتطبيق التنظيمات والإرشادات الموضوعة بمعرفة اللجنة القومية للأمان الحيوى .

ب– يقوم المفتش العام بزيارة الموقع فور تلقيه طلب تصريح وذلك لتقييم أجهزته وإمكانياته ، على أن يقدم تقريراً للجنة القومية للأمان الحيوى وبناء عليه يتم إصدار التصريح أو رفضه .

ج – تعليم وإرشاد العاملين فى ممارسة الأساليب التكنولوجية للتأكد من توفر مستوى الأمان المطلوب .

٢– اللجنة العلمية للأمان الحيوى (IBC) Institutional Biosafety Committee

على اللجنة القومية للأمان الحيوى أن تلزم كافة المعاهد التى تعنى بأبحاث الـ r-DNA أن تكون لجنة علمية للأمان الحيوى بكل منها .

٢–١– مهام ومسئوليات اللجنة

تكون اللجنة مسئولة عن التأكد من أن أبحاث الـ r-DNA تجرى بصورة متوافقة مع إرشادات اللجنة القومية للأمان الحيوى . وكجزء من مسئوليتها العامة بشأن تنفيذ هذه الإرشادات يمكن للجنة العلمية للأمان الحيوى القيام بوضع إجراءات إضافية فيما قد يكون ضروريا لأحكام الأنشطة العلمية .

٢–٢– أعضاء اللجنة

حتى يمكن التأكد من الكفاءة اللازمة لمراجعة أوجه النشاط الخاصة بأبحاث الـ r-DNA يوصى بالآتى :

أ – أن تضم اللجنة أفراداً من ذوى الخبرة فى مجال تكنولوجيا الـ r-DNA لتغطية اتجاهات البحث فى المعهد .

ب– أن تضم اللجنة أعضاء من ذوى الخبرة فى مجال الأمان الحيوى والاحتواء .

ج – أن يتوفر لدى اللجنة استشاريين ممن لديهم المعرفة بأهداف المعهد والسياسات والقانون .

د – أن تعين اللجنة مسئول (ضابط) للأمان الحيوى تتوفر لديه الشروط المحددة بالجزء ١–٤ .

٢-٣- أوجه نشاط اللجنة

أ – جمع مجموعة شاملة من إرشادات البحث والاحتواء المتوافقة والتى يمت إعدادها للأنشطة البحثية للمعهد بما يتطابق مع إرشادات اللجنة القومية للأمان الحيوى.

ب- وضع برنامج خاص بالتفتيش للتأكد من استمرار الاحتواء الطبيعى للمرافق فى مقابلة الاحتياجات .

ج – تقييم المرافق والإجراءات وكذلك التدريب والخبرات لدى الأفراد المعنيين بأنشطة الـ r-DNA .

د – المراجعة الدورية لأبحاث الـ r-DNA التى تجرى فى المعهد للتأكد من استيفاء إرشادات اللجنة القومية للأمان الحيوى .

هـ-تبنى خطط طوارىء لمجابهة التسرب الفجائى وتلوث الأفراد قد تنتج من مثل هذه الأبحاث .

و – المراجعة الدورية للمعايير والتيسيرات الخاصة لمنع التسرب مع الأخذ فى الاعتبار المعلومات العلمية والفنية الحديثة المتصلة بمعالجة النفايات وتسرب المخلفات ذات التأثير البيولوجى الخطر .

ز – متابعة المتغيرات التى تطرأ على حقوق الملكية الفكرية التى تصدر على المستويين القومى والعالمى .

ح – رفع تقرير سنوى للجنة القومية للأمان الحيوى .

٢-٤- ضابط الأمان البيولوجى

يقوم المعهد بتعيين ضابط للأمان الحيوى تتوفر لديه الدراية بمتطلبات الأمان الحيوى للعمل فى مجال r-DNA وإمكانياته وتنحصر واجباته فى الآتى :

أ – الالتزام بالسياسات والتنظيمات المتفق عليها مع التأكد من عدم تعارضها مع أى اعتبارات أخرى .

ب- التأكد من خلال التفتيش الدورى من اتباع تعليمات المعامل بكل صرامة .

ج- التأكد من توفر عناصر الأمان للعمل فى المعامل ومنع حوادث تسرب الأحياء المعدلة التركيب الوراثى .

د – الاحتفاظ بقاعدة معلومات فى جميع نواحى الأمان الحيوى المتعلقة بالمحاصيل الواردة من الخارج .

هـ–فحص وإعطاء المشورة لإصدارات الأمان الحيوى بصفة يومية .

و – التنبيه باحتياجات الأمان الحيوى للـ r-DNA واسع الانتشار والاشتراك كعضو بلجنة الأمان الحيوى مع رفع تقارير بكل الإصدارات المتعلقة بها .

الجزء الثانى : إرشادات (احتياطات) الأمان الحيوى

١– تقدير أو تقييم المخاطر

إن مدى تعرض صحة العاملين والآخرين بالقرب من مكان العمل هو العنصر الرئيسى الهام فى تقدير المخاطر المصاحبة لاستخدام الكائنات الحية المحورة وراثيا .

هذه المخاطر تتناسب مع مجال وطبيعة العمل وكل الأجهزة المنظمة تفضل الاستخدام المحدود لها فى مجال البحث والتنمية .

أما الاستخدام الواسع النطاق الذى قد يسبب خطورة على الصحة أو البيئة المحيطة وزيادة المخاطر المحتملة بالبيئة عندما قد يحدث تسرب الكائن الحى من منطقة الإنتاج لذلك فأنه يجب استخدام طرق أخرى أكثر صرامة لاحتواء هذه الخطورة .

الاحتواء ممكن أن يكون عملا طبيعيا ومثال ذلك الحواجز التى تحد من تسرب الكائنات الحية أو احتواء حيويا ومثال ذلك التحكم الفسيولوجى فى حيوية وتضاعف وتكاثر الكائن خارج البيئة الأصلية .

فى عام ١٩٨٩ وضعت الأكاديمية الدولية للعلوم (NAS) الأسئلة الثلاثة التالية للحكم على درجة الخطورة :

١–هل نحن ملمين بخواص الكائن الحى والبيئة المحتمل استقدامه إليها ؟

٢–هل نستطيع أن نتحكم فى الكائن الحى بكفاءة ؟

٣–ما هى التأثيرات المحتملة على البيئة وهل الكائن الحى أو الخاصية الوراثية المستقدمة تبقى لوقت أطول من المتوقع أو تنتشر بالبيئة الغير مستهدفة ؟

إن التكنولوجيا الحديثة تثير العديد من الأسئلة على درجة الخطورة والتى تفتقر الى قلة أو انعدام المعلومات التى تساعد فى تقييمها .

والتعريف المقترح يكون :

الخطر = احتمالية الخطورة × درجة الخطورة

كما شرح مسبقا أن التكنولوجيا الحيوية تهدف الى إنتاج محاصيل بخواص جديدة مفيدة للجنس البشرى وهذا يعنى إذا كان هناك أى زيادة فى الخطورة يجب أن يتوازن مع المنفعة الناتجة من المحصول الجديد وسنعتبر الخطر بأنه الخطر المقبول .

$$\text{الخطر المقبول} = \frac{\text{احتمال المخاطرة} \times \text{درجة الخطورة}}{\text{المنافعة من المنتج}}$$

وحتى يتسنى لنا فهم الظروف التى يمكن أن تؤدى الى تحول نبات معدل التركيب الوراثى الى حشيشة ضارة أو ذو تأثير ضار على البيئة ، فأنه يجب معرفة تأثير العوامل فى الموديل التالى :

معدل زيادة النبات المعدل التركيب الوراثى فى بيئة معينة = معدل نمو وتكشف النبات

+ إنتاجه للبذور (الوقت والمدة)

+ بقاء الأجزاء الخضراء حية (مطروح منه معدل الموت)

– تأثير المنافسة مع النباتات الأخرى من نفس النوع

– تأثير المنافسة مع الأنواع الأخرى من النباتات

– تأثير الآفات الزراعية (الحشرات والفقريات)

– تأثير الفطريات وأمراض النبات الأخرى

+ هجرة البذور المنقولة وراثيا من أماكن أخرى

+ معدل إنتاج النباتات المعدلة التركيب الوراثى من بذور ساكن فى التربة

يجب أن تقيم الظروف التى يجرى تحتها البحث بالكائنات الحية المحورة وراثيا بأمان بالمقارنة مع الظروف المقبولة طبيعيا لإجراء بحوث على الكائنات الحية الأصلية (الابوية) .

وعلى ذلك فأن تقييم الأمان يكون ضروريا لتحديد مستوى العمل الأمنى .

٢- تحديد مستوى العمل الأمنى LSC

أوصت اللجنة الاستشارية لبحوث التكنولوجيا الحيوية الزراعية بخطوات متدرجة للسكرتير المساعد للعلوم والتربية لتقييم مستوى العمل الآمنى للكائنات الحية المحورة وراثيا والتى تنقسم الى ثلاث مستويات وتحديد مستوى العمل الأمنى ذو أهمية عظمى لتحليل خطورة استخدام الكائنات المحورة وراثيا على صحة الإنسان والنظام البيئى الطبيعى .

الخطوة الأولى :

تحديد مستوى العمل الآمنى للكائنات الأصلية (الابوية) والتى تعتمد على خاصيتين هما :

١-درجة الخطورة على صحة الإنسان والبيئة المحيطة او النظام البيئة الطبيعى .

٢-القدرة على التعامل أو التحكم فى الكائن الحى أثناء استقدامه المخطط الى البيئة وبناءاً عليه يجرى البحث بطريقة آمنة .

المستوى الأول للعمل الأمنى للكائنات الحية الأصلية (الابوية)

الكائن الحى يؤدى الى خطر قليل للصحة وليس هناك خطر غير معقول على البيئة المعاملة أو النظام البيئى الطبيعى . هذه الكائنات الحية والتى لها مساهمات بيئية فى البيئة الخاصة المستقبلة تكون مفهومة .

بعض المساهمات فى الخليط ممكن أن تشير الى المستوى الأول هى :

١-ليس هناك تاريخ لآثار سيئة فى البيئة المستقبلة .

٢-قدرة ضئيلة على التحور لتصبح كائنات حية ضارة فى البيئة المستقبلة (سهلة الوصول) .

٣-احتمال ضئيل لبقائها فى البيئة المستقبلة (سهلة الوصول) .

المستوى الثانى للعمل الأمنى للكائنات الحية الأصلية (الآباء)

الكائنات الدقيقة والتى لها مساهمات بيئية فى البيئة المستقبلة ممكن أن تؤدى الى خطورة مع صحة الإنسان والتى ليست بالضئيلة أى ممكن تؤدى الى ضرر أو خطورة غير معقولة للنظام البيئي الطبيعي والتى يمكن ويجب أن تعامل وتحكم بواسطة حصر مناسب (وضع مناسب) .

المستوى الثالث للعمل الأمنى للكائنات الحية الأصلية (الآباء)

الكائنات الحية التى لها صفات بيئية فى البيئة المتقبلة يمكن أن تؤذى الى خطورة على الصحة الآدمية والتى ليست بصورة ضئيلة أو تؤدى الى خطر غير معقول للبيئة المعاملة أو النظام البيئى اللطبيعى . وليس هناك حصر يمكن إجراءه ليؤكد أن التطبيق الآمن للبحث خارج الإمكانيات المتوفرة .

بعض الخصائص التى تحدد المستوى الثالث للأمان للكائنات الحية هى :

١-ثبات لتأثير ضار على البيئة المخصصة .

٢-القدرة على البقاء والانقسام فى البيئة .

٣-ليس له حالة مستقرة فى البيئة .

٤-كثرة تبادل المعلومات الوراثية مع تأثير ضار .

٥-افتقاد الطرق المؤثرة للحد من انتشار أو تسرب الكائنات الحية .

٦-افتقاد الطرق الكافية للسيطرة أو منع حالات الانتشار .

الخطوة الثانية : تحديد تأثير التغيرات الوراثية على مستوى العمل الأمنى

يجب أن يقيم التغيرات الوراثية على أساس تأثيرها على صفة الكائن الحى الأصيل (الابوى) والتى قد تم تقيمها فى الخطوة الأولى . حيث أن التحور الوراثى قد لا يكون له تأثير على الأمان أو يتطلب زيادة الأمان الحيوى .

تأثير التحور الوراثى على الأمان يجب أن يقيم على الأسس التالية :

١-تأثير مباشر للكائن الحى على صحة الإنسان أو البيئة .

٢-تأثير غير مباشر للكائن الحى من خلال المواد التى ينتجها .

٣-تأثيرات التبادل الوراثى مع الكائنات الحية الأخرى .

فى الخطوة الثانية يجب على الباحثين أن يفحصوا طريقة التحور الوراثى والخواص الجزيئية وثبات الجينات المحورة والتعبير والوظيفة وتأثيرات الجينات المحورة .

النوع الأول : التحور الوراثى الذى يقلل العمل الأمنى للكائنات الحية المحورة

التحورات التى تمنع أو تعوق نشاط الجين أو الجينات المسئولة عن الصفات مثـال ذلك : القدرة على إحداث المرض والخصوبة والبقاء والتلاءم بطريقة تـؤدى الـى زيـادة الأمان للكائن الحى .

النوع الثانى : التحور الوراثى الذى ليس له تأثير على العمل الأمنى للكائن الحى المحور

يتطلب ذلك دراية واعية بالبيولوجية الجزيئية والعلوم الأخرى التى تطلب الخـبرة المناسبة والتى توضح أن التحور قد تم توصيفه جيدا وأن وظيفة الجين وتـأثيره قـد تـم استيعابها لتوقع الأمان .

التحورات تشمل :

١-إدخال أو حذف أو إعادة ترتيب جزء من الأحماض النووية والذى ليس لـه أى عواقب فى المظهر الخارجى أو الوراثى فى البيئة .
٢-إدخال او حذف أو إعادة ترتيب الأحماض النووية التى لها عواقب متوقعة فـى المظهر الخارجى أو الوراثى فى البيئة وغير مرغوبة وممكن أن تـؤدى الـى تأثير ضار إضافى الى الصحة الآدمية والبيئة .

النوع الثالث : التحور الوراثى الذى يزيد العمل الأمنى للكائن الحى المحور

تشمل التحورات ما يلى :

١-إدخال أو حذف أو إعادة ترتيب الأحماض النووية التـى تؤثـر علـى تعبـير الجينات ولكن الوظائف أو التأثيرات ليس مفهومة بصورة كافية بالتأكيد مـا إذا كان الكائن الحى المحور يؤدى الى خطر أكبر من الكائن الحى الغير محور .
٢-إدخال او حذف أو إعادة ترتيب الأحماض النووية والتى لها عواقب معروفة أو متوقعة فى الشكل الظاهرى أو الوراثى فى البيئة التى تؤدى الى أثـار سـيئة إضافية على صحة الإنسان والبيئة .

الخطوة الثالثة : تحديد مستوى العمل الأمنى للكائنات الحية المحورة وراثيا

تصنف الكائنات الحية المحورة وراثيا تبعا لدرجة الأمان الحيوى المطلوبة الى ثلاث مستويات تبعا لتأثير التحور الوراثى على خصائص أو صفات الكائن التى تأثرت وقد تؤدى الى تغير مستوى العمل الآمنى للكائنات الحية المحورة بالمقارنة بالكائن الحى الغير محور.

– مستوى العمل الأمنى للكائن الحى المحور وراثيا يعتمد على نفـس الخصـائص المطبقة لتقدير أو تحديد مستوى العمل نفس الخصائص المطبقة لتقدير أو تحديـد مسـتوى العمل الأمنى للكائن الحى الأصيل (الأبوى) .

المستوى الأول (الكائن الحى الأصيل)

- المستوى الأول للعمل الأمنى للكائن الحى الأصلى مع النوع الأول من التحور يعتبر LSC-1 للكائن الحى المحور وراثيا .
- المستوى الأول للعمل الأمنى للكائن الحى الأصلى من النوع الثاني من التحور يعتبر LSC-2 للكائن الحى المحور وراثيا .
- المستوى الأول للعمل الأمنى للكائن الحى الأصلى من النوع الثالث من التحور يؤدى الى LSC-1 , LSC-2 , LSC-3 كائنات حية محورة وراثيا تعتمد على درجة العمل الأمنى كالأتى :

١-إذا كان التحور من النوع الثالث يؤدى الى زيادة طفيفة فى العمل الأمنى وعليه الخطر لصحة الإنسان تبقى طفيفة أو مهملة والخطورة للبيئة المعاملة أو النظام البيئى الطبيعى . تبقى معقولة بدون الاحتياج الى مقاييس منع وعليه تبقى الكائن الحى المحور وراثيا LSC-1 .

٢-إذا كان التحور من النوع الثالث يؤدى الى زيادة العمل الأمنى للدرجة التى فيها الخطورة لصحة الإنسان ليست مهملة أو الخطر للبيئة أصبح ليس معقول ولكن الحصر الممكن إجراءه والمتاح لإجراء البحث مع وجود خطورة ضئيلة على صحة الإنسان والبيئة ومن ثم الكائن الحى المحور يكون LSC-2 :

٣-إذا كان التحور من النوع الثالث يؤدى الى زيادة العمل الأمنى للدرجة التى يكون فيها الإدخال للبيئة غير مستطاع التعامل معه أو التحكم فيه بصورة كافية لتحقيق خطورة ضئيلة على صحة الإنسان وخطورة معقولة على البيئة . ومن ثم يكون الكائن الحى المحور يكون LSC-3 .

المستوى الثانى للكائن الحى الأصيل (الأبوى)

١- المستوى الثانى من العمل الأمنى للكائن الحى الأصيل من النوع الأول التحورات تؤدى الى LSC-1 أو LSC-2 للكائن الحى المحور وراثيا تتوقف درجة العمل الأمنى على ما يلى :

أ – لو كان التحور من النوع الأول يقلل العمل الأمنى الى الحد الذى يؤدى فيه الكائن الحى الى خطورة منعدمة أو ضئيلة على صحة الإنسان وخطورة معقولة على النظام البيئى المعامل أو الطبيعى . بدون الحاجة الى مقاييس حصرية وعليه يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-1 .

ب–لو كان التحور من النوع الأول يقلل العمل الأمنى والخطورة علـــى صحـــة الإنسان تكون منعدمة والخطورة على النظام البيئى الطبيعى أو المعامل تكون معقولة فقط عندما تعامل باستخدام المقاييس الحصرية وعليه يكـــون الكـــائن الحى المحور وراثيا LSC-2 .

٢– المستوى الثانى من العمل الأمنى للكائن الحى الأصيل من النوع الثانى المحـــور يظل LSC-2 كائن حى متحور وراثى . مقاييس حصرية مناسبة ضرورية لنشر المخطـــط فى البيئة .

٣– المستوى الثانى من العمل الأمنى للكائن الالحى الأصيل مـــن النـــوع الثـــالث المحور ينتج فى LSC-2 أو LSC-3 كائن حى محور وراثى . تعتمد على درجة الزيـــادة فى العمل الأمنى كالآتى :

أ – إذا كان المستوى الثالث للتحور يرفع من درجـــة الأمـــان الحيـــوى ولكـــن الإدخال المخطط للبيئة يظل ممكن معاملته أو التحكم فيه بواســـطة قياســـات حصرية مناسبة ومن ثم يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-2 .

ب– إذا كان النوع الثالث للتحور يرفع درجة العمل الأمنى للدرجة التى يكـــون معها تأكيد غير معقول بأن الإدخال المخطط فى البيئة يمكـــن أن يعـــامل أو يحكم . ومن ثم يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-3 يجـــرى البحـــث تحت مقاييس حصرية حتى يكون هناك تأكيد بأنه يحكم بأسلوب آمن .

المستوى الثالث للكائنات الحية الأصلية (الأبوية)

المستوى الثالث للعمل الأمنى للكائن الحى الأصيل من النوع الأول المتحور يـــؤدى الى كائن حى محور وراثيا LSC-1 , LSC-2 , LSC-3 معتمدا على درجة التقليل فـــى العمل الأمنى كما يلى :

١–لو كان النوع الأول من التحور يقلل العمل الأمنى الى الدرجة التى فيها الإدخال المخطط فى البيئة يؤدى الى خطورة منعدمة أو قليلة علـــى صحـــة الإنســـان خطورة معقولة على النظام البيئى المعامل أو الطبيعى وعليه يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-1 .

٢–لو كان النوع الأول من التحور يقلل العمل الأمنى ولكن المقـــاييس الحصريـــة تكون ضرورية للإدخال المخطط فى البيئة مع خطورة منعدمة لصحة الإنســـان

وخطورة معقولة للنظام البيئى المعامل أو الطبيعى وعليه يكون الكـــائن الحـــى المحور وراثيا LSC-2 .

٣-لو كان النوع الأول من التحور يقلل العمل الأمنى ولكن ليس للدرجة التى يمكن بها معاملة أو التحكم فى الإدخال المخطط للكائن الحى لتحقيق خطورة منعدمـــة على صحة الإنسان وخطورة معقولة للنظام البيئى الطبيعى أو المعامل ومن ثـم وعليه يكو الكائن الحى المحور وراثيا LSC-3 .

يجب أن يجرى البحث فى إمكانيات متاحة .

- المستوى الثالث من العمل الأمنى للكائنات الحية الأصلية مع النـــوع الثـــالث أو الثانى من التحور ينتج كائنات حية محورة وراثيا LSC-3 .

٣- احتياطات الأمان الحيوى

احتياطات الأمان الحيوى مصممة للتأكد من أن المنتجات من التكنولوجيا الحيويـــة ليس لها تأثير على البيئة أو الزراعة وكذلك منع انتشار الميكروبات المهندسة وراثيـــا مـــن الانتشار العشوائى .

بالإضافة لحماية الجماعات المحيطة المتعاملين والباحثين فى مجال استخدام مثل هذه المنتجات بدءا من مرحلة البحوث حتى التوزيع التجارى .

٣-١- احتياطات الأمان الحيوى بالمعامل

١-ممنوع تخزين الأطعمة وتناول المأكولات والمشروبات والتدخين .

٢-ممنوع استخدام الماصات التى تستخدم بالفم .

٣-ارتداء الملابس الخاصة بالمعمل إجباريا ويجب أن تخلع قبـــل الخـــروج مـــن المعمل .

٤-يجب أن تطهر الأسطح المستخدمة بواسطة الصابون والكحول بعد انتهاء العمل اليومى .

٥-النفايات أو الفضلات يجب أن تظهر بواسطة التعقيم أو الحرق .

٦-تكرار غسيل الأيدى إجباريا (على الأقل تواجد حوض واحد لغسل الأيدى) .

٧-يجب اجتناب لمس الميكروبات المحورة وراثيا والمواد البيولوجية المستوردة ويجب لبس الجوانتى عند التعامل مع هذه المواد ولا تستخدم هذه الجوانيلت إلا مرة واحدة .

٨-أبواب المعامل يجب أن تكون مغلقة طوال الوقت .

٩-التعامل مع الكيماويات المنتجة للأبخرة داخل المكان المخصص لذلك .

١٠-علامات التحذير يجب أن تعلق دائما فى المعامل .

٣-٢- احتياطات أو إرشادات خاصة بالأمان الحيوى للصوبات (البيوت الزجاجية)

- يجب أن تكون الصوب مغلقة دائما .
- درجة الأمان الحيوى وكود ورمز الأمان يجب ان يكون معلق على مدخل الصوبة .
- نظام الهواء يجب ألا يسمح بانتشار حبوب اللقاح أو الميكروبات المحورة وراثيا من الصوب .
- جميع أجزاء النبات سواء حية أو غير حية أو النباتات التى أدخلت فى الصوب عن التخلص منها يجب تعقيمها أولا أما إذا كانت ستخزن فيجب أن يكون التخزين فى أماكن أخرى مجهزة وفى هذه الحالة يجب مراعاة شروط الأمان وأثناء النقل .
- المياه الناتجة يجب أن تعالج كيميائيا قبل أن يتم تصريفها .
- يجب ارتداء الملابس الخاصة بالصوب طوال الوقت ويجب تعقيم هذه الملابس قبل الخروج من الصوب لأى سبب .
- يجب غسيل الأيدي قبل الدخول وعند الخروج من الصوب .
- وجود دواسة مغموسة فى مادة مطهرة عند مدخل الصوب .
- تسجيل يومى للتجارب التى تجرى فى الصوب .

٣-٣- احتياطات الأمان الحيوى فى التجارب النصف حقلية

- ممنوع إجراء التجارب الحقلية بواسطة آفات نباتية مستوردة وممرضة .
- يجب منع حبوب اللقاح الخاصة بالنبات من الانتشار عن طريق إزالة الزهور.

- يجب أن تغطى الزهور قبل النضج إذا كان هناك حاجة للزهور فى إقامة التجربة .
- تصميم مناسب للعزل يجب أن يقام بحيث يتجنب انتشار الزهور الى مناطق أخرى قريبة .
- ممنوع الدخول فى المناطق المعزولة لغير المسموح لهم .
- يجب أن تتخذ احتياطات خاصة للتأكد من عزل النبات أو أجزاء منه عند الحصاد .
- يجب أن يكون محمى من دخول الحيوانات والحشرات عن طريق عمل أسوار محيطة بالمكان .

تقييم الظروف البيئية

تقييم الظروف البيئية تمثل :

- النتائج العلمية والمعلومات الأخرى من الهيئات الحكومية قبل إصدارها للسماح للاختبارات الحقلية المحدودة والمرتبطة بالنباتات المهندسة وراثيا على أن تجرى فى نطاق اختبار ضيق .
- تقييم الظروف البيئية وتحليل النتائج للتأكد من أن المحاولة الحقلية ذات النطاق المحدود سوف لا تؤدى الى مخاطرة عند اجراءها وليس لها مغزى على نوعية البيئة البشرية .
- وذلك يتم تقييمه خلال ما يعرف بإيجاد صدمة ليس ذات أهمية . سوف تحدد ما إذا كان السماح يجب أن يصدر أو يمنح على عدة عوامل قليلة . وهناك مثال واضح فى المقطع رقم ٤ .

٤- النقط المحتواة المأخوذة فى الاعتبار

- هل الكائن الحى المهندس وراثيا له تأثير على المجتمعات النباتية معرض للخطر أو مهدد للكائن الحى والإنسان وصحة النبات والحيوانات وكذلك على المصادر الوراثية (مثال قابلية الأجناس الاقتصادية الهامة للمبيدات الزراعية أو المبيدات الحشرية ، أو الإنتاج الزراعى) .
- ما هى معدلات إمكانية الحياة للكائنات المحور فى الحالات المتغيرة مثال وجودها فى المنطقة متحررة أو البيئة المحيطة .

- ما هى معدلات تكاثر الكائنات فى هذه المناطق ؟ ما هى مقدرة الكائنات على الانتشار من المنطقة المنتشرة منها ؟
- ما هى مقدرة الكائنات على الانتشار خارج المنطقة الموجودة بها ؟
- ما هى وسائل الإنتشار ؟ وما هى العواقب الناتجة عن وجود هذه الكائنات فى البيئة بعد الخطة أو الوقت المخطط له ؟
- ما هى الطرق المستخدمة للتحكم أو التخلص من الميكروبات أو الكائنات الحية من المكان والبيئة المحيطة وهل هذا الإجراء مطلوب ؟ وما مقدرة أو كفاءة هذه الطرق ؟

النبات

انتشار الجينات المهندسة وراثيا بواسطة حبوب اللقاح هو أحد الاهتمامات الرئيسية آخذين فى الاعتبار أن يكون التصميم التجريبى ومكانة وحالات الطقس كافية للحد من انتقال الجينات الى النباتات المتماثلة جنسياً .

الكائنات الحية الدقيقة المصاحبة مع النبات

- هل الكائن الحى قادر ليعبر عن نفسه فى أو على النوع الغير مستهدف فى البيئة المحيطة .. الى أى مدى يمكن للكائن أن يعيش ويتكاثر على أو فى النبات المستهدف أو النباتات الأخرى فى المكان المختبر والبيئة المحيطة .
- هل الخصائص المحورة وراثيا يمكن أن تنتقل الى كائنات حية دقيقة أخرى فى البيئة .
- هل هناك أى تأثير على الكائنات الحية الدقيقة بالتربة والتى تعتبر نافعة للنبات (مثال ذلك الرايزوبيوم وفطريات الميكوريزا) .
- هل تستطيع الكائنات الحية الدقيقة المهندسة وراثيا أن تنتشر بواسطة الرياح والماء والتربة والكائنات الحية المتحركة أو بطرق أخرى .

REFERENCES

Abel-Al, Z.E. (1994). The integration of biotechnology for sustainable agriculture and rural development into Arab countries. FAO, Near East Regional Office, Cairo, Egypt. pp. 1-63.

Anon, National Biological Impact Assessment Program (NBIAP) News Report. 1990-91-92-93-94-95. Information Systems Virginia Polytecyhnic Institute USA.

Compeau, G.C., W.D. Mahaffey and L. Patras, (1991). Full scale bioremediation of contaminated soil and water. Environmental Biotechnology for Waste Treatment, Plenum Press pp. 91-109.

Dowidar, A.M., A.F. Farag, A.H. Abdall, A.M. Ibrahim, ,.A. Tanan and M.A. Shaheen. (1994). Biology for Third Year Secondary p. 399.

Economidis, I. (1992). Biosafety research in the European Community: Results and prespectives. International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. pp. 135-140.

El-Nawawy; A.S. and M.H. El-Kattan (1994). The beneficial use of agricultural waste disposal in the Near East (Arabic). FAO Regional Office, Cairo, Egypt. p. 105.

Franklin, F.C.H. (1985). The impact of biotechnology on agriculture Biotechnology News. 5; 7.

Harlander, S.K. and R.G. Garner. (1986). The future of biotechnology in food processing. USDA Yearbook of Agriculture. pp. 52-55.

Jong, S.C. and M.A. Birmingham. (1994). Fungi/yeast as transformation hosts for production of foreing proteins. American Type Culture Collection (ATCC) Quarterly Newsletter ll pp. 1-11.

Kearney, P.C. (1986). Soil microbes could help clean the environment. USDA Yearbook of Agriculture. pp. 60-61.

Molina, F.I., L. Geletka, and S.C. Jong. (1995). High-resolution DNA fingerprinting of microorganisms at ATCC. American Type Culture Collection (ATCC) Quarterly Newsletter 1: pp. 103.

Papavizas, G.C. and J.E. Loper. (1986). Biotechnology and soilborne diseases. USDA Yearbook of Agriculture. pp. 62-65.

Rochelle, P.a. and B.H. Olson, (1992). Bacterial detoxification of mercury in sediment. International Sympsoium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Goslar, Germany, pp. 149-152.

Stotzky, G. (1992). Gene transfer among and ecological effects of genetically modified bacteria in soil. International Symposium on the Biosafety Results of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Goslar, Germany. pp. 122-134.

Toet, D.A. (1992). Effect of rDNA technology on safety requirements for enzyme production and preparations. International sympsoium on the Biosafety Results of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Goslar, Germany pp. 201-203.

Wong, W.K.R., C.I. Curry, R.S. Parekh, M. Wayman, R.W. Davis, D.G. Kilburn and N. Skipper. (1988). Wood hydrolysis by Cellulomonas fini endonuclease and exoglucanase coexpressed as secreted enzyme in Saccharomyces cerevisiae Biotechnology, 6: pp. 713-719.

الباب الرابع عشر
النظرة التجارية للتكنولوجيا الحيوية في حماية المزروعات

مقدمـــــة :

من أهم الموضوعات المطروحة الآن ودائما فى مواجهة تحقيق الإنتـاج الزراعـى المنشود الفقد الذى تحدثه الآفات فى المحصولية والجودة . لقد مرت مجابهة هذا التحدى من الآفات بمراحل تاريخية اختلفت مدخلاتها ووسائلها والتى أنتهت بالإسراف فـى اسـتخدام المبيدات وما أستتبعه من مشاكل بيئية خطيرة فى كثير من دول العالم حتى المتقدمة وفـى النامية أكثر . الان ومنذ بداية التسعينيات اختلفت المفاهيم والوسائل لمجابهة الافات تحـت مظلة كبيرة تستهدف تقليل الاعتماد على المبيدات . أصبحت نظم الإدارة للسـيطرة علـى الآفات هى الأساس والهدف بالإضافة الى تربية الأصناف النباتية المقاومة للآفات وللأسـف الشديد مازالت الغلبة فى مجابهة الآفات هى الكيميائيات الزراعيـة (مبيـدات حشـائش – مبيدات فطرية – مبيدات حشرية ... وغيرها) . إن الاعتماد علـى المكافحـة الكيميائيـة والوثوق فيها عالى جدا مع تكاليف باهظة وأضرار مؤكدة ومؤثرة على البيئة بينما استخدام البدائل والمحاصيل المهندسة وراثيا كى تقاوم الآفات مثل الفيروسات والحشرات ما زالـت فى الطريق عن قرب للأسواق .

البيانات التى جمعت بواسطة مجموعة خدمات استخدام المبيدات التابعـة لـوزارة الزراعة والأسماك والغذاء فى إنجلترا أوضحت حجم ودرجة استخدام المبيدات فى مكافحـة الأمراض . لقد أشاروا فى عام ١٩٩١ أن مبيدات الحشائش تستخدم فى أكثر من ٩٠% من كل الزراعات المحصولية بمتوسط معاملتان باستخدام مركبان وثلاثة مواد فعالة . المبيـدات الفطرية تستخدم فى أكثر من ٩٥% من زراعات البطاطس والقمـح والشـعير الشـتوى . المبيدات الحشرية تستخدم فى متوسط ٧٣% من كل الزراعات مرة واحدة . على مسـتوى العالم تشير التقديرات أن المبيدات الفطرية ستظل المدخل الأساسى فـى تكـاليف الإنتـاج الزراعى فى العديد من أجزاء العالم . فى عام ١٩٩٠ وجد أن ٢١% مـن كـل مبيعـات الكيميائيات الزراعية كانت من المبيدات الفطرية (٥,٥ مليون دولار أمريكـى) (Carner وآخرون ، ١٩٩٢) . الفلاحين وكبار الزراع عندهم ميل ورغبة وحمـاس شـديد لتقليـل تكاليف مدخلات الإنتاج خاصة فى فترات فيض وزيادة الإنتاج ووقوف حركة السـوق أو خفض الأسعار . الآن هناك حاجة قوية لصناعة التقاوى لتطوير المنتجات والتـى تتطلـب تقليل أو عدم استخدام المدخلات الخاصة بالكيميائيات الزراعية .

القطن من المحاصيل التى حظت بإدارة مكثفة تتطلب متوسط إدخال مبيدات فى حدود ٣٠,٦٧ دولار لكل آكر أو ما يزيد عن ٣٥٤ مليون دولار كل سنة فى أمريكا وحدها. مازالت الآفات من مجموعة مفصليات الأرجل تسبب فقد ٢٧٣ مليون دولار من إنتاج الألياف سنويا . الاعتماد الزائد على المبيدات الحشرية الكيميائية أدى الى ظهور مشكلة مقاومة الآفات للمبيدات وخفض تعداد الأعداء الطبيعية . من الاهتمامات الأخرى التى نجمت عن هذا الوضع الضرر والتلف الكبير على البيئة من جراء استخدام كميات طائلة من المبيدات . هندسة نباتات القطن المقاومة للآفات تعتبر من الاتجاهات التى تثير الاهتمام فى الوقت الحالى من الناحيتين الاقتصادية والبيئية . المبيد الحيوى يجب أن يكون متخصصا على الآفات المستهدفة ويحقق الفاعلية مع الجرعات المنخفضة كما لا تكون له أو يتكون قليل من المقاومة بواسطة الحشرات المستهدفة وكذلك لا يسبب أضراراً على الكائنات غير المستهدفة . البروتين التى تبيد الآفات الحشرية من البكتريا أو النباتات أو الحيوانات أصبحت محل جذب كبير للبحاث والعاملين فى مجال السيطرة على الآفات .

التكنولوجيا الحيوية قطاع يتوسع بسرعة رهيبة تصاحبه فوائد عظيمة وضخمة خاصة فى مجال وقاية النباتات من منطلق الأهمية الاقتصادية الضخمة والنواحى الاجتماعية المحددة . فى سنوات الازدهار فى القرن العشرين كان الناس تتطلع الى مجيء اليوم الذى يرون فيه واقع نقص أو خفض استخدام المبيدات فى مكافحة الآفات والأمراض النباتية فى المحاصيل الزراعية (Coombes ، ١٩٩١) . لقد كان ذلك حقيقيا فى الدول المتقدمة كأمريكا واليابان والدول الأوربية كما اتضح من اهتمام الناس ورغبتهم فى استخدام مخرجات الهندسة الوراثية لتحقيق المقاومة للأمراض فى المحاصيل وكذلك فى مجال المبيدات الحيوية الزراعية من خلال بعض الشركات العالمية الكبرى مثل زينيكا – سيباجيجى – مونسانتو – رون بولانك . إن تطوير وتطور الطرق مثل الهندسة الوراثية والعمليات الحيوية والأجسام المضادة وحيدة الكلونة هندسة البروتينات ومزارع الأنسجة واندماج البروتوبلاست فى السبعينيات كانت واعدة فى فتح مجالات جديدة وفرص عالمية لحماية المزروعات وزيادة العائدات فى التكنولوجيا الحيوية الزراعية . فى الزراعة تم تعريف مساحات ومناطق ذات احتمالات واعدة لاستخدامات التكنولوجيا الحيوية . تحسين التربة النباتية من خلال الهندسة الوراثية يتوقع أن يؤدى للحصول على نباتات مهندسة وراثيا تقاوم الحشرات والأمراض النباتية . مناطق حماية المزروعات سوف تشهد وسائل جديدة للمكافحة الحيوية ومحاصيل مقاومة لمبيدات الحشائش (chataway ، ١٩٩١) . لقد كان هذا الاقتراب ومازال واعداً فى تحقيق عائدات مجزية عن الاستثمار وسوف يؤدى الى صب أموال طائلة فى الصناعة . الاكتشافات من التكنولوجيا الزراعية الحيوية سوف

يكون ذو فائدة مباشرة للفلاحين وكبار الزراع خاصة إذا كانت مخرجاتها على صورة تقاوى لأصناف نباتية جديدة .

المدى الذى تؤدى التطورات والتقدم العلمي والتقنى الى الحصول على أصناف نباتية جديدة تتأثر بعوامل عديدة مثل هيكل الصناعة والتقدم التقنى ومجال حماية الملكية ونظم التشريع . البحث والتطوير فى مجال التكنولوجيا الحيوية الزراعية مكلف ويستغرق وقتا طويلا . حماية هذه التكنولوجيا الجديدة للتأكد من أن المنتج قد حقق أرباحا من هذا الاستثمار في غاية الأهمية . فى المؤتمر الدولى الأول عن علوم المحاصيل الذى عقد عام ١٩٩٢ أثيرت نقطتان فى غاية الاهتمام لمربى النباتات الأول يتمثل فى حفظ حقوق الملكية والثانى استخدامات التكنولوجيا الحيوية النباتية . لقد أصدرت الدول المتقدمة نظم تشريع تحافظ وتحمى حقوق اختراع المنتجات والعمليات التى أدت للحصول عليها من خلال وضع نظام احتكار محدود المدة لمنتجى هذه التكنولوجيا . لقد أخذت هذه الحقوق صورا مختلفة وأطلق عليها حقوق الملكية الفكرية (IPRs) . الاحتكار أو براءات الاختراع والأسرار التجارية والنسخ والتقليد والصنف النباتى كل هذه صور من (IPRs) . بالنسبة لصناعة التقاوى كانت أهم صور الملكية IPRs هى حقوق ملكية الصنف النباتى (PVRs) ويطلق عليها كذلك حقوق ملكية مربى النباتات (PPRs) والاحتكار Patents . هذين النظامين صمما ليعملا بشكل إجبارى .

منظور العامة Public Perception

منظور العامة ورؤية العامة نحو التكنولوجيات الجديدة من العوامل الهامة الواجبة الاعتبار عند إدخال الأصناف النباتية الناتجة من التكنولوجيا الحيوية . إن المخاوف من أمان المحاصيل المهندسة وراثيا قد تحدث خلل فظيع فى إدخال هذه الأصناف المتحولة بينما النواحى الخاصة بتأثيرات حماية حقوق الملكية على الأصناف والجينات الجديدة فى برامج التربية اللاحقة تخلق تشويش داخل الصناعة نفسها . فى هذا المقام سوف نشير باختصار الى الطرق الجارية المتوفرة لحماية منجزات التكنولوجيا الحيوية .

حقوق الملكية الفكرية وحماية الاختراع بالاحتكار

حقوق الملكية الفردية تشمل أسرار التجارة وأسرار معرفة التوصل لهذه التكنولوجيا Know how وحقوق التصميم والتقليد والمعلومات السرية وحقوق الاحتكار وحقوق مربى النباتات . كل هؤلاء ينعمون بحماية ولكن بدرجات متباينة . التطوير التقنى فى التكنولوجيا الحيوية الزراعية ركز على الاحتكار وحقوق مربى النباتات وسبل حمايتها . التشريعات التى تحمى هذه الملكة الفكرية يجب أن تنشط تطور الصناعة وتشجع التعاون بين مربى

النباتات وصناعة التكنولوجيا الحيوية والفلاحين والقائمين علـــى تجــهيز المنتجــات . إن اكتشاف تكنولوجيا جديدة تتطلب تنسيق بين حقوق الملكية والاحتكار والقوانين التى تــؤدى إليها .

لم تقتصر اتفاقيات جولــة أورجــواي علــى معالجــة الأمــور المتعلقــة بالســلع والخدمات ، بل امتدت أيضا لوضع القواعد الخاصة بالتعامل مع الجانب المتصلة بالتجــارة من حقوق الملكية الفكرية .

ولا شك أن القواعد المتعلقة بحقوق الملكية الفكرية هى قواعد قديمة بدأت مع ظهور الحاجة لحماية هذه الحقوق . ومع بدء التضارب بين القواعد الوطنية التى تتبناهـــا الـدول المختلفة لتحقيق هذه الحماية . بدأ السعى الى إبرام اتفاقيات دوليـــة لتنظيـم حمايـــة هــذه الحقوق. وعلى ضوء انعكاس آثار قواعد حماية هذه الحقوق على الاستغلال التجارى لــها ، نشأت الحاجة الى الاتفاق على قواعد متعلقة بالجوانب المتصلة بالتجارة من حقوق الملكيــة الفكرية وهى تلك القواعد التى تم بلورتها فى أحد الاتفاقيات الصادرة فـــى إطــار جولــة أورجواى باسم " اتفاق بشأن الجوانب المتصلة بالتجارة من حقوق الملكية الفكرية "

AGREEMENT ON TRADE – RELATED ASPECTS OF INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS (TRIPS) .

ولكن دعونا نتعرف أولا عن ماهية الحقوق الملكية الفكرية هذه .

تعريف حقوق الملكية الفكرية

حقــوق الملكيــة الفكريــة INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS (IPRs) هى حق المؤلف والمفكر والمخترع والمبتكر فى منع الآخريـــن مــن اســتغلال اختراعهم وتصاميمهم وأفكارهم وما أبدعته عقولهم . فالقيمة الحقيقية لبعض الســـلع مثـل الأدوية والمنتجات عالية التقنية والكتب والأفلام وغيرها لا تتمثل فى المواد المصنوعة منها هذه المنتجات بل فيما تتضمنه السلعة من فكر واختراع وتصميم يحــق لصاحبــه تســجيله وتوفير الحماية اللازمة له والتى تحول دون استغلال الآخرين له بغير إذنه وموافقته .

ولكن لماذا يحتاج استغلال حقوق الملكية الفكرية للتنظيم :

من المسلم به حق المؤلف والمخترع والمصمم فى حماية فكره واختراعه وتصميمـه من استغلال الآخرين لأفكارهم واختراعاتهم تجاريا لما فى ذلك من انتهاك لحــق المؤلــف والمبتكر هذا من ناحية ، ومن ناحية أخرى فان التقييد الشديد والمستمر لحقــوق اســتغلال الاختراعات كان يؤثر سلبا على نمو التجارة الدولية ونمو حركــة الاســتثمارات الأجنبيــة

خاصة مع التقدم فى فنون النسخ والتقليد ، الأمر الذى كان يسفر عن انتشار حالات التجارة فى السلع المقلدة أو ما يعرف بتعبير القرصنة التجارية بالنسبة لحقوق المؤلف والمبتكر وما يترتب عليه من خسائر كبيرة فى إيرادات المؤلفين والمؤسسات الصناعية صاحبة الاختراع الأصلى .

وقد بدأت جهود حماية حقوق الملكية الفكرية منذ أكثر من قرن ونشأت عدد من المنظمات لهذا الغرض آخرها المنظمة العالمية للملكية الفكرية The World Intellectual Property Organization (WIPO) القائمة حاليا .

وتم إبرام العديد من الاتفاقيات لتحديد الالتزامات الدولية لحماية حقوق أصحاب الملكية الفكرية أشهرها اتفاقية باريس ، معاهدة بودابست ، اتفاقية لاهاى ، اتفاقية لوكارنو ، اتفاق مدريد ، اتفاق نيس ، اتفاق لشبونة ، اتفاق برن ، اتفاقية جنيف ، اتفاقية بروكسل ، الاتفاقية العالمية لحقوق المؤلف ، الاتحاد الدولى لحماية أصناف النباتات الجديدة (UPOV) وغيرها من الاتفاقيات .

ومع التفاوت الكبير فى قواعد الحماية وأسلوب تنفيذها بين الدول المختلفة ، وعلى ضوء الأهمية المتزايدة لآثار حقوق الملكية الفكرية على التجارة ، وعلى ضوء تزايد المنازعات حول استخدام هذه الحقوق وآثار ذلك على العلاقات الاقتصادية بين الدول ، نشأت الحاجة الى وضع قواعد دولية متفق عليها لحقوق الملكية الفكرية .

ولكن ما هى انواع حقوق الملكية الفكرية

تشمل حقوق الملكية الفكرية :

- حقوق المؤلف والحقوق المرتبطة بها Copyright and Related Rights وتشمل حقوق الإبداع الأدبى والعلمى والأعمال الفنية .
- براءات الاختراع Patents وتمنح للمخترعين عن أفكارهم الجديدة القابلة للاستغلال الصناعى .
- العلامات التجارية Trademarks ويدخل فيها العلامات الخاصة بالخدمات Service Marks .
- النماذج الصناعية Industrial Designs وتشمل الابتكارات الجديدة التى تتعلق بالمظهر الخارجى والجمالى للمنتج الصناعى .
- مخططات تصاميم الدوائر المتكاملة Layout – Designs or (Topographies) of Integrated Circutis

- المؤشرات الجغرافية Geographical Indicators والتى تدل على منشأ السلع .
- المعلومات السرية Undisclosed information بما فيها أسرار التجارة Trade Secrets .

وقد تم المعاملة المقررة لكل من هذه الأنواع من حقوق الملكية الفكرية فى القسم الثانى من اتفاقية التربس فضلا عن مكافحة الممارسات غير التنافسية فى التراخيص التعاقدية Contractual Licenses .

حقوق الملكية الفكرية فى الزراعة

الاحتكار أو براءة الاختراع أو صيانة الملكية Patents

براءة الاختراع تعنى حقوق الملكية الموثقة والصادرة فى السلطات المسئولة والتى تستبعد الآخرين من استخدام أو الاستفادة من الاختراع تحت الحماية بدون إذن من صاحب البراءة . البراءات تمنح للأفراد والشركات الذين يطالبون بحماية المنتج الجديد أو عملية تصنيع جديدة أو تحسين منتج موجود أو عملية تصنيع موجودة والتى لم تعرف من قبل . منح البراءة تعطى الممنوح حق الاحتكار حتى يمكن استغلال أو بيع الاختراع لفترة محددة من الوقت فى العادة تكون ٢٠ عاماً وقت تقديم الطلب للحصول عليها . عودة الى هذه البراءة والحقوق يقوم طالب منح البراءة بدفع رسوم تغطى تكاليف عملية إعطاء البراءة والحفاظ على كل تفاصيل العملية . لا يمكن نشر ٨٠% على الأقل من المعلومات المقدمة للحصول على البراءة تحت أى ظرف من الظروف .

السؤال المطروح عن ما هى المواد التى تحصل على براءات الاختراع تحت مظلة هيئة التراخيص الأوربية (EPC) ؟ الإجابة عن هذا السؤال تستدعى التعريف بالمواد ٥٢ ، ٥٣ فى قائمة EPC وهى كالتالى :

- مادة ٥٢ : الاختراعات التى تستوجب البراءة : البراءات الأوربية سوف تمنح لأية اختراعات ذات القابلية للاستخدامات الصناعية والتى تدخل فى نطاق الجديد كما تتضمن خطوة كشف واختراع جديدين .
- مادة ٥٣ : إعفاء من براءة الاختراع : Exemption to patentability

أ – اختراعات النشر أو الإعلان (الاستغلال) والتى تكون على عكس " أمر للعامة أو الموت " والتى تؤدى الى أن الدعاية لا تكون معاكسة لأنها ممنوعة بالقانون أو بالتشويع فى بضع أو كل الولايات المتعاقدة .

ب- الأصناف النباتية أو الحيوانية او العمليات البيولوجية الضرورية لإنتاج النباتات أو الحيوانات ، هذا التوجه لا يطبق على العمليات الميكروبيولوجية أو المنتجات الحيوية منها .

لذلك ولكى تصبح براءة الاختراع صالحة يجب أن تحقق عدة معايير (Van Dullen ، ١٩٩٢) نذكرها فيما يلى :

١-يجب أن تكون جديدة : أى يجب ان تكون أصلية كبراءة اختراع كما تكون جديدة فى أى نموذج أو إصدار منشور ، بالإضافة الى ذلك فان الطلب الخاص بالبراءة لايقبل إذا قام المتقدم بوصفه وإفشاء (فيما عدا السرية) أو إذا كان المنتج يصنع قبل تقدم الطلب فانه من الأمور الحيوية الحفاظ على السر حتى ذلك الوقت . فيما عدا ذلك فان الاختراع سيكون متاحا لأى صانع .

٢-يجب ألا يكون واضحا ومكشوفا : هذا يعنى أن المنتج الخاص بطلب البراءة يجب ألا يكون من جراء تحسين متنبأ به لشئ موجود فعلا أو تم وصفه المراجع . من الناحية النظرية إذا اعتقد أو قام المخترع التى يعرف كل شيء عن الاختراع بالتفكير فى أن الفكرة عبارة عن خطوة اختراع جديدة تكون البراءة غير واضحة .

٣-يجب أن تكون البراءة مفيدة : أى تحقق فوائد عملية بدلا من أن تكون ملاحظة علمية أو عمل من قبيل الغش .

٤-يجب أن تكون قابلة للتكرار الصناعى : هذا المعيار يؤخذ بهدوء شديد لأن العديد من براءات الكيميائيات كمثال تشير الى مواد غير قابلة للتكرار أو معاودة التصنيع فى البيئة .

٥-يجب ألا تكون غير مشروعة أو غير أخلاقية : من أمثلة البراءات غير المشروع اصطياد الرجال أو ماكينات الغش ولو أن بعض البلدان تسمح بالبراءات غير المشروعة إذا كان المتقدم يقصد تصدير المنتج لدول تصنعه فى المشروع .

٦-يجب ان تكون البراءة تفصيلية : يجب أن تكون البراءة مكتوبة وموثقة بتفاصيل كافية لدرجة أن أى خبير عنده مهارة يستطيع عمل نفس الاختراع . هذا مطلب أساسى والفشل فى تقديم التفصيلات المطلوبة يؤدى الى رفض إعطاء التراخيص .

بعض مراتب الاختراعات غير قابلة للحصول على البراءات مثل شرائط الكمبيوتر وصور الحياة الراقية (الفئران المهندسة وراثيا) ولو أن الأخيرة ستجد طريقها للحصول على البراءة قريبا . البراءات الخاصة بالنباتات تشمل حقوق ملكية الصنف النباتى . الولايات المتحدة الأمريكية تصدر براءات للنباتات منذ تم وضع قانون براءات الاختراع للنباتات فى عام ١٩٣٠ وقد تم التصريح وإعطاء أكثر من ٦٥٠٠ براءة . اليابانيون صرحوا ببراءات الاختراع النباتية منذ عام ١٩٧٠ . مكتب البراءات الأوربية (EPO) . استبعد الأصناف النباتية من ضرورة الحصول على براءة الاختراع ولكن المكتب الأوربى وبعد إنشاء السوق الأوربية المشتركة أصر على ضرورة الحصول على براءة الاختراعات للنباتات حماية للتحويرات الوراثية كما فى حالة الذرة المحتوى على جين إضافى . البراءة الأولى التى أصدرت فى هذه المرتبة غطت محاصيل الأعلاف مثل البرسيم ذات المحتوى العالى من البروتينات .

إذا أخذ فى الاعتبار تعقيدات وسرعة التقدم فى التكنولوجيا الحيوية تتأكد من وجود أسباب قوية لافتراض أن المعايير الخاصة بحماية براءة الاختراع ممكن تنفيذها . أنواع الاختراعات واجبة البراءة تشمل مزارع الأنسجة وطرق التضاعف الدقيقة وطرق دمج البروتوبلاست وطرق إدخال الجين والناقلات والجينات المعزولة وبادئات ومحفزات الجينات وناهيات التتابعات . البراءة تمتد لتشمل النباتات التى طورت باستخدام هذه الطرق أو تحتوى على هذه الجينات أو أجزاء من الجينات . لقد صدرت العديد من البراءات تركز على نوع النبات : مثال ذلك نباتات النوع (أ) المقاومة للحشرة (ب) من خلال نقل الجين . هذه البراءة ترتبط بالنبات وليس بالصنف النباتى .

حقوق الملكية الفكرية فى الزراعة

فى المؤتمر الثامن للاقتصاديين الزراعيين الذى عقد يومى ٢٧ ، ٢٨ سبتمبر عام ٢٠٠٠ قام أ.د. عادل محمد خليل بإلقاء محاضرة بنفس العنوان " حقوق الملكية الفكرية فى الزراعة " وهى منشورة فى إصدار المؤتمر . بدأت المحاضرة بتعريف حقوق الملكية الفكرية ثم تساءل لماذا يحتاج استغلال حقوق الملكية الفكرية للتنظيم كما تناول أنواع حقوق الملكية الفكرية (حقوق المؤلف – براءات الاختراع – العلاقات التجارية – النماذج الصناعية – مخططات تصميم الدوائر المتكاملة – المؤشرات الجغرافية – المعلومات السرية) . بعد ذلك تناول موضوع الملكية الفكرية فى الزراعة والتى سأضعها كما هى على ان استكمل الباقى من النصوص الأجنبية حيث بدا لى أننا نعمل من نفس المصدر .

فيما يتعلق بحماية النباتات والحيوانات ، فإن اتفاقية الجوانب التجارية المتعلقة بحقوق الملكية الفكرية (التربس) قد سمحت فى مادتها رقم ٢٧ فقرة ٣ ب للدول بأن تستثنى من الحماية بموجب براءات اختراع ما يلى :

أولا : النباتات والحيوانات خلاف الأحياء الدقيقة Micro – Organisms .

ثانيا : العمليات التى تكون بيولوجية أساسا (أو الطرق البيولوجية فى معظمها) والتى تستخدم لإنتاج النباتات والحيوانات خلاف الأساليب والطرق غير البيولوجية والعمليات البيولوجية الدقيقة Micro Biological Process .

وفى هذه الحالة – حالة استبعاد حماية الأصناف النباتية والحيوانية ببراءات اختراع يمكن أن تتم الحماية لنظام Suigeneris System بهذه الأنواع (كالذى تتضمنه اتفاقية حماية الأصناف النباتية الجديدة UPOV) .

والآن اسمحوا لى بإلقاء نظرة سريعة على اتفاقية اليوبوف التى وضعها الاتحاد الدولى لحماية النوعيات الجديدة من النباتات .

والأوبوف UPOV هو الاتحاد الدولى لحماية الأصناف النباتية الجديدة International Union For The Protection of Varieties of Plants (UPOV) وهو منظمة دولية حكومية مقرها جنيف ، ولقد تأسس الأبوف بموجب الاتفاقية الدولية لحماية الأصناف النباتية الجديدة (اتفاقية الأوبوف) التى وقعت فى باريس سنة ١٩٦١ ودخلت حيز النفاذ فى ١٩٦٨ وتمت مراجعتها سنة ١٩٧٢ ، ١٩٧٨ ، ١٩٩١ ودخلت الأخيرة حيز التنفيذ فى ٢٤ أبريل ١٩٩٨ .

وهدف اتفاقية الأوبوف هو ضمان اعتراف الدول أعضاء الاتحاد بإنجازات مستنبطى (مستولد) Breeders الأصناف النباتية الجديدة عن طريق منحهم حق ملكية استئثارى أو حصرى Exclusivright على أساس مجموعة موحدة وواضحة من المبادىء

وتكون الأصناف النباتية قابلة للحماية إذا كانت :

١-جديدة New أى لم يسبق ترويجها تجاريا قبل تاريخ طلب الحماية .

٢-متميزة Distinct عن أنواع نباتية موجودة ومعروفة .

٣-متجانسة Uniform بشكل كاف .

٤-وثابتة Stable .

وتحدد الاتفاقية الحد الأدنى للحماية مع إمكانية مراعاة الدول الأعضاء للظروف الوطنية فى تشريعاتها .

وتقضي قواعد الاتفاقية وأيضا الملاحق بحق مستنبط / مستولد النبات Breeders فى الحصول على تصريح سابق من صاحب الحق – إذا لم يكن هو نفسه صاحب الحق – لإنتاج الصنف بغرض الاتجار فيه فى الأسواق وعرضه للبيع وتسويق مواد الإكثار الخاصة بالصنف المحمى .

وتمنح حقوق مستنبط (مستولد) النباتات شأنها شأن كل حقوق الملكية الفكرية لفترة محددة من الزمن ، ولا يجوز وفقا للمادة ١٩ (٢) من اتفاقية الأوبوف ان تزيد المدة المذكورة عن ٢٠ سنة اعتبارا من تاريخ منح حق مستولد النبات وبالنسبة لأشجار الكروم لا يجوز أن تزيد هذه المدة عن ٣٥ سنة اعتبارا من التاريخ المذكور ، وعند نهاية هذه الفترة تدخل الأصناف المحمية فى الملك العام وتخضع الحقوق للمراقبة ضمانا للمصلحة العامة وتفاديا للاستعمال التعسفى .

وتجدر الإشارة الى أن الحصول على تصريح من صاحب الحق (مسئول النباتات) ليس ضروريا فى حالة الاستعمال لأغراض البحث بما فى ذلك استعماله فى استولاد أصناف جديدة أخرى .

ولكن لماذا ينبغي حماية الأصناف النباتية الجديدة ؟

توفر الحماية للأصناف النباتية الجديدة كحافز لتطوير الزراعة وأعمال البساتين وحماية مصالح مستولدى النباتات والأصناف المحسنة .

ونظراً لأن استنباط أصناف نباتية جديدة يحتاج الى استثمارات كبيرة من حيث المهارة العامة والموارد المادية والمال والوقت فان حصول مستولد النباتات الناجح على بعض الحقوق الحصرية أو الاستئثارية لصنفه الجديد تتيح له فرصة أفضل لتغطية التكاليف وجمع الأموال الضرورية لاستثمارات أخرى .

ولا شك أن عضوية دولة فى اتحاد الأوبوف تعنى رغبتها فى حماية مستولدى النباتات بالاستناد الى مبادئ مسلمة ومعترف بها فى كل أنحاء العالم ، وتمنح عضوية الدولة فى الاتحاد مستولدى النباتات فى أراضيها إمكانية الحصول على الحماية فى سائر الدول الأعضاء وتوفر حافزا لمستولدى النباتات الأجانب للاستثمار فى مجال استنباط النباتات وإنتاج البذور فى أراضيها ، فضلا عن الاستفادة من خبرة الدول الأخرى فى هذه المجالات .

كما تجدر الإشارة الى أن اتحاد الأوبوف قام بإعداد قانون نموذجـــي Model law لحماية الأصناف النباتية الجديدة ، وقد تم نشر هذا القانون النموذجي لأول مرة فـــى عـــام ١٩٨٠ وتم إعادة صياغته بواسطة اللجنة الإدارية والقانونيـــة للاتحـــاد الدولـــى لحمايـــة الأصناف النباتية الجديدة فى دورتيه عن عامي ١٩٩٤ ، ١٩٩٥ .

والنموذج المذكور ليس إلا نموذج تأخذ منه الدول بما يتناسب مع أوضاعها القانونية والإدارية والتشريعية وغيرها من العوامل بحيث تطوع قوانينها المحليـــة لتقـــترب بقـــدر الإمكان من أحكام القانون النموذجى المذكور .

وينقسم القانون النموذجى الى خمسة أجزاء تغطى الموضوعات التالية :

الجزء الأول : غرض ومجال تطبيق القانون .

الجزء الثانى : النص الأساسى للقانون ويغطى ذلك حقوق المستنبطين Breeder's Rights أو ما يعرف بحق مستولد النبات والأشخاص الذين يحـــق لهم الحصول على هذه الحقوق ، وحقوق حاملى الحق The Right of The Holder وأسلوب نقل الحقوق وتراخيص استغلال الحقوق وانقضاء حق مستولد النباتات .

الجزء الثالث : ويشمل الإجراءات التنفيذية لطلب منح وتسجيل الحقوق .

الجزء الرابع : ويختص بوسائل تنفيذ حق مستولد النباتات .

الجزء الخامس والأخير : ويشمل الأحكام النهائية والانتقالية .

هذا وتجدر الإشارة الى أن اللجنة العلمية والفنية والبحثية التابعة لمنظمـــة الوحـــدة الأفريقية قد تبنت منذ عام ١٩٩٧ إعداد تشريع نموذجى أفريقى لحماية حقوق المجتمعـــات المحلية والمزارعين ومربى النبات والحيوان وتنظيم الحصول على الموارد البيولوجية على ضوء عدم وجود قوانين قومية فى كل دولة أفريقية تتفق وأحكام اتفاقية الجوانب التجاريـــة المرتبطة بحقوق الملكة الفكرية (التربس) التى أسفرت عنها جولة أورجواى ، ولتطويـــر موقف أفريقى موحد بشأن مراجعة هذه الاتفاقية الجارية حاليا فى منطقة التجارة العالمية .

وقد عقدت اللجنة عدة اجتماعات شارك فيها الخبراء من الدول الأفريقية وتمت هـــذه الاجتماعات فى منظمة الشرق والجنوب الأفريقى شاركت فيها كل من : كينيا – زيمبـــاوى – أوغندة – مالاوى – زامبيا . ثم عقد مؤخراً فى الفترة من ٧ – ١٠ يونيو ٢٠٠٠ اجتماعا بالعاصمة الجزائرية شارك فيه خبراء من الجزائر وكوت دفوار وإثيوبيا وغانا ، وتم خـــلال

هذه الاجتماعات مراجعة التشريع النموذجي الأفريقي لحماية حقوق المجتمعات المحلية والمزارعين ومربي النبات والحيوان وتنظيم عملية النفاذ الى المصادر البيولوجية ، ليكون بمثابة إطار مرجعي للدول أعضاء المنظمة .

وقد صدر عن اجتماع الخبراء عدة توصيات أهمها :

١-حث حكومة الجزائر ، باعتبارها رئيس الدورة آنذاك لمنظمة الوحدة الأفريقية ، على تنظيم مؤتمر اقليمي في أفريقيا حول موضوع التشريع الأفريقي المقترح .

٢-حث الدول أعضاء المنظمة الأفريقية على عقد اجتماعات شبه إقليمية لبحث مشروع القانون النموذجي .

٣-حث الدول أعضاء المنظمة الأفريقية على عقد اجتماعات قومية أو إجراء مشاورات لبحث مشروع القانون النموذجي .

٤-حث حكومات الدول الأفريقية والمؤسسات المعنية على تقييم الموارد البيولوجية وإنشاء آلية لحماية بيانات التقييم .

٥-إعادة إحياء الاتفاقية الأفريقية لحماية الطبيعة والموارد الطبيعية التي أقرتها الدول الأفريقية في عام ١٩٨٦ ولم يتم تنفيذها على نطاق واسع حتى الآن .

٦-تأييد الدول الأفريقية للاقتراح الخاص بمراجعة اتفاقية الملكية الفكرية الذى قدمته المجموعة الأفريقية في منظمة التجارة العالمية .

٧-حث الدول والمؤسسات المانحة على تقديم المزيد من المساعدات المالية للدول الأفريقية (بما في ذلك إلغاء الديون) حتى يمكنها مواصلة جهودها للحفاظ على التنوع البيولوجي .

يتمثل الهدف الرئيسى للتشريع الأفريقي في ضمان وضع سبل الحفاظ على وتقييم الاستخدام المتواصل للمصادر البيولوجية بما في ذلك المصادر الجينية الزراعية والمعرفة والتكنولوجيا من أجل الحفاظ على تنوعها وتحسين هذا التنوع كوسيلة لتعزيز كافة نظم دعم الحياة .

وتشمل الأهداف المحددة لهذا التشريع في الآتى :

١-الاعتراف بحقوق المجتمعات المحلية وحمايتها بما في ذلك مجتمعات المزارعين بشأن المصادر البيولوجية والمعرفة والتكنولوجيا .

٢-الاعتراف بحقوق أصحاب مزارع الماشية وحمايتها .

٣-توفير نظام مناسب للوصول الى الموارد البيولوجية .

٤-تشجيع وجود آليات مناسبة من أجل تحقيق المشاركة العادلة والمنصفة للمزايا الناجمة عن استخدام المصادر البيولوجية والمعرفة والتكنولوجيا .

٥-ضمان المشاركة الفعالة للمجتمعات الريفية فى صنع القرار بالنسبة لتوزيع المزايا التى تنتج عن استخدام الموارد البيولوجية .

٦-تشجيع الحفاظ عل المصادر البيولوجية وتقييمها واستخدامها بشكل مستدام مع التركيز بصفة خاصة على الدور الرئيسى للمرأة .

٧-تشجيع إدخال تحسينات على إنتاجية وربحية واستقرار واستمرارية نظم الإنتاج الرئيسية من خلال التنوع البيولوجى والحفاظ عليه .

٨-تشجيع توفير البذور وغيرها من مستلزمات الزراعة بجودة عالية للمزارعين .

٩-ضمان استخدام الموارد البيولوجية بأسلوب فعال ومنصف من أجل تعزيز الأمن الغذائى للدولة .

كما تجدر الإشارة الى أن مؤتمر وزراء التجارة لمنظمة الوحدة الأفريقية المنعقد بالقاهرة خلال الفترة من ١٦ – ١٩ سبتمبر ٢٠٠٠ قد أدرج فى جدول أعماله بندا بشأن بحث مشروع القانون النموذجى الأفريقى لحماية حقوق المجتمعات المحلية والمزارعين ومربى النبات والحيوان وتنظيم الحصول على الموارد البيولوجية ، وذلك استجابة الى قرار مجلس وزراء منظمة الوحدة الأفريقية فى واجادجو عام ١٩٩٨ الذى يطلب من الدول الأعضاء إبداء الاهتمام الواجب على سبيل الأولوية الى الحاجة الى تنظيم الحصول على الموارد البيولوجية والمعارف والتكنولوجيات المرتبطة بالمجتمعات المحلية وانعكاسات ذلك على حقوق الملكية الفكرية التى أرساها نظام التجارة العالمى واتفاق حقوق الملكية الفكرية المتصلة بالتجارة (TRIPS) .

ولقد أصدر السادة وزراء التجارة الأفارقة فى ختام اجتماعهم المذكور يوم ١٩ سبتمبر ٢٠٠٠ عددا من توصيات بخصوص هذا الموضوع نوردها فيما يلى :

أن الوزراء :

أ – يأخذون علما بمشروع القانون النموذجى الأفريقى لمنظمة الوحدة الأفريقية ويقررون إحالته الى الدول الأعضاء لإخضاعه لمزيد من الدراسات ، بغية التوعية بالقانون النموذجى ، توطئة للاجتماع المقرر أن تستضيفه الجزائر .

ب- يرحبون بعرض حكومة الجزائر الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية استضافة مؤتمر إقليمى أفريقى يضم خبراء قانونيين وغير قانونيين للنظر فى مشروع القانون النموذجى الأفريقى لمنظمة الوحدة الأفريقية ، وذلك فور تدبير التمويل اللازم للاجتماع .

ج - يطلبون من حكومات الدول الأعضاء فى منظمة الوحدة الأفريقية ممن هم أعضاء فى منظمة التجارة العالمية أن تؤكد ، مجددا ، قرارها السابق بشأن مراجعة اتفاق حقوق الملكية الفكرية المتصلة بالتجارة (TRIPS) بعامة والمادة ٢٧ - ٣ (ب) بخاصة .

د - يحثون على التعاون الوثيق مع المنظمات الدولية الشريكة مثل الاتحاد الدولى لحماية أنواع النبات الجديدة ، ومنظمة التجارة العالمية ، والمنظمة العالمية للملكية الفكرية، والتماس مساعدتها من أجل المضى قدما على طريق هذه المبادرة .

بعض المعلومات الإضافية المكملة فى موضوع الحماية الفكرية الزراعية

فى عام ١٩٩١ أثير موضوع الأصناف النباتية المرتبطة " Degendent "

بسبب المخاوف من التكنولوجيات الجديدة فى ان تؤدى الى انتحال أصناف جديدة مع هندسة وراثية قادرة على إدخال جينات لتحقيق صفات معينة كما فى حالة الأصناف المقاومة للحشرات والفيروسات . المواد ١٤ (١-٤) من القانون الأوربى تغطى الأصناف التى تشتق بالضرورة من الصنف المحمى أو غير الواضح تمييزه او الذى يتضمن إنتاجه الاستخدام المتكرر للصنف تحت الحماية . الصنف المحمى معروف أما المشتق منه يحتفظ بكل الصفات فى الأصناف الأولية وهو يتواءم مع الطراز الوراثي أو خلائطها .

لقد قدر معدل احتفاظ الفلاحين بالتقاوى من حصاد ما للزراعة فى الموسم التالى للمحصول على محصول تجارى من محاصيل الحبوب الصغرى بمقدار ٨٩% فى استراليا ، ٨٥% فى أسبانيا ، ٧٠% فى كندا وأمريكا ، ٤٥% فى فرنسا ، ٣٠% فى إنجلترا . هذا يمثل فقد كبير جدا فى النواحى المالية لمربى النباتات وتجار التقاوى . تحت مظلة المعاهدة او الاتفاقية التى أبرمت عام ١٩٩١ يعتبر الشخص الذى يحتفظ بالتقاوى من محصول موسم للزراعة فى مواسم أخرى مخالف لحقوق مربى النباتات . على العكس فى أمريكا حيث لايعتبر الشخص الذى يخزن التقاوى من زراعته هو أى من حقوله التى زرعها بتقاوى حصل عليها من سلطات التقاوى التى تملك كل حقوق ملكية الصنف .

براءات الاختراعات فى مقابل حقوق ملكية مربى النباتات

توجد اختلافات كبيرة بين صورتى حماية الملكية تتراوح من التكاليف وحتى التعقيدات الخاصة بالشرعية (جدول ١٤-١) . براءات الاختراع تقدم حماية عظيمة عن حقوق ملكية مربى النباتات حيث أن الحقوق تمتد (طوال فترة حياة البراءة والاحتكار) لكل الأجيال المتتابعة للنبات . الأصناف الجديدة التى يحصل عليها بالتهجين العبورى بين الأب المحمى بالبراءة مع أب آخر قد يكون متوافق لكلا البراءة وحقوق المربين . المربين ينظرون لبراءات الاختراع على أنها تشريع يثبط التبادل الحر واستخدام المادة الوراثية التى يعتقد المربين أنهم يقومون بتحسينها . الشركات تقول بأنها لا تقصد تقييد الاستفادة من الجيرمبلازم ولكن لو أن المربى قام بتسويق صنف نباتى يحتوى على الصفة صاحبة براءة الاختراع مثل المقاومة للحشرات يجب عليه الحصول على إذن من صاحب براءة الاختراع. تعضيد حقوق براءة الاختراع من خلال الأجيال المتتابعة من التربية من الأمور الصعبة ولقد وضعت اقتراحات تريد تحديد وتقييد وحقوق البراءة على الأصناف النباتية التى استخدمت فى البداية . على المربى أن يدفع مقابل مجزى حتى يصبح حر فى استخدام النباتات المسجلة فى برامج التربية المتتابعة دون تكرار الدفع للضريبة .

جدول (١٤-١) : مقارنة بين الرؤية الأساسية لصلاحيات الصنف النباتى تحت منظمة الأبوف ١٩٩١ وقوانين براءات الاختراع بوجه عام .

الرؤية والمجالات	الأبوف ١٩٩١	قانون براءات الاختبار
* تغطية الحماية	* الأصناف النباتية لكل الأجناس والأنواع	* الاختراع
* المتطلبات	* الجديد – التمييز – التجانس	* الجديد – اختراع – استخدام صناعى
* دورة الحماية	* ٢٠ سنة على الأقل (OECD) فى أوربا	* ١٧ – ٢٠ سنة
* مجال الحماية	* استخدام تجارى لكل مواد الصنف	* الاستخدام التجارى للمادة المحمية
* إعفاءات للمربين	* ليس للأصناف المشتقة	* لا توجد
* الفوائد للفلاحين	* حتى مستوى القوانين الأهلية القومية	* لا توجد

خطوات الحصول على براءات الاختراع

خطوات استكمال بيانات الحصول على براءة الاختراع وملأ الاستمارات وإعداد الملفات عملية طويلة ومن ثم تعتبر من أكثر الأمور تعقيدا وصعوبة . لذلك تحتاج هذه الخطوة الى تعاون بين المخترعين ومسئولى إصدار براءات الاختراع . التقدم بطلب حماية براءة الاختراع يتم عادة وفى البداية فى بلد الإقامة أو بلد تطبيق واستخدام المنتج بواسطة المتقدم . هذا يضع ميعاد أولوية (سبق) والذى يكون مميزا فى معظم دول العالم الأخرى تحت مظلة المعاهدة الدولية فى هذا الشأن والتى يطلق عليها " معاهدة باريس " هذا يؤخر التكلفة الباهظة لبرنامج براءات الاختراع الأجنبية حتى نهاية السنة الأولى بعد الميعاد الأول لتقديم الملف في بلد المنشأ . الطلب للحصول على براءة اختراع فى أوربا على نفس مستوى الطلبات القومية فى الدول الأخرى . هذه السنة الانتقالية الوسطية ذات قيمة كبيرة جدا لكلا الطرفين الصناعية والهيئات الأخرى التى تجابه بمشاكل خاصة بتقييم كفاءة التطبيقات الصناعية لنتائج البحوث الجديدة . هناك ميزة أخرى تتمثل فى أن المخترع يستطيع أن ينشر تفاصيل اختراعه دون أن يضر ببراءة الاختراع التى حصل عليها أو تقدم للحصول عليها بمجرد أخذ تاريخ أولوية عن الاختراع . لذلك فان الاختراع يجب أن يعرف بوضوح ويعضد جيدا بالبيانات من أول يوم طلب الحصول على البراءة والملف الأجنبى يجب ألا يستغرق أكثر من سنة من ميعاد تقديم الطلب الأول .

التقدم بطلب الحصول على براءة الاختراع

للحصول على براءة الاختراع يجب أن يجهز ملف خاص بكل البيانات المطلوبة من قبل مكتب براءات الاختراع كما يتم فحص الملف المقدم للتأكد من شرعية الطلب وتمشية مع القواعد موضوعة على أساس التقدم للحصول على البراءة منظم ومبنى على معاهدة باريس لحماية حقوق الملكية الصناعية لعام ١٨٨٣ والتى تخضع لها معظم دول العالم . فى العادة يطلب تقديم طلبات منفصلة فى كل دولة تقر بمبدأ الحماية ولكن الطلب فى إحدى الدول الأوربية يكون صالحا لبقية الدول الأوربية . هذا يحدث تحت مظلة الاتفاق الأوربى الخاص ببراءات الاختراع (EPC) . على العكس فان هيئة التعامل لبراءات الاختراع (PCT) تقدم على أساس طلب واحد دولى بلغة واحدة وذلك للملف الدولى والبحث واللذان يكونا صالحان فى أى من الدول المشتركة فى هيئة (PCT) . هذه الهيئة PCT تدار من خلال المنظمة العالمية لحقوق الملكية الفكرية (WIPO) فى جنيف ولقد ملأت أول ملفات للـ PTC فى يونيو عام ١٩٧٨ . بعد ذلك يقوم مكتب البراءات بعمل بحث مرجعى عن الوثائق المنشورة فى السابق بما فيها البراءات المرجعية والنواحى العلمية لتقديـ_ وتحديد موقف الطلب ثم يفحص الطلب للتأكد من صحة محتوياته خاصة ما يقع تحت مسمى

المواصفات . هذه المرحلة تتضمن فى العادة بعض الانتقادات حول المواصفات خاصة فى مجال البنود وقد تأخذ وقت حتى تمر ويوافق عليها تبعا للقواعد والتشريعات الموضوعة .

بعد إصدار براءة الاختراع قد يظهر فى الأفق طرف ثالث يعارض هذه البراءة ويقدم بنود اعتراضه ومبرراتها وقد يقدم نفس المنتج أو مشابه له أو منتج به إضافات وهذه جميعا يجب التغلب عليها بواسطة المتقدم وتفنيد كل نقطة على حدة . هذا يطلق عليه المعارضة ويتضمن نقد واعتراض ما بين المتقدم ومسئولى براءة الاختراع والمعارض والأخير له كل صلاحيات وحقوق الأطراف الأخرى . القانون الأمريكى لبراءات الاختراع لا يسير على هذا النسق من حيث المعارضة والاعتراض لكنه يسمح لطرف ثالث التقدم بطلب إعادة فحص ملف الاختراع فى ضوء البيانات الجديدة التى لم تكن أخذت فى الاعتبار . خطوات والهيكل الزمنى لخطوات الحصول على براءات الاختراع بوجه عام موجودة فى الشكل (١٤-١) .



شكل (١٤-١) : خطوات التقدم للحصول على براءات الاختراع .

الاختلافات بين قانون براءة الاختراع فى إنجلترا وأمريكا

توجد بعض الاختلافات بين قوانين براءات الاختراع فى الدول المختلفة ولكن من أكثر النقاط الهامة تلك المتعلقة بمحتويات وأسس بيانات الملف الأول .

الأسبقية فى قانون براءة الاختراع تحدد وتقرر ليس من خلال تاريخ تقديم الملف فقط ولكن بالمحتويات المقدمة ، لذلك فان المتقدم يجب أن يكون على علم ودراية بما هو مطلوب . مثال ذلك ما حدث من تقاضى بين شركتين يابانيتين هما أساهى ودينيبون فى حق ملكية وسبق الحصول على براءة الاختراع ولمن تحقق الأسبقية فى اقتراح خاص بتتابع الحامض النووى " الدنا DNA " . نفس الحالة حدثت بين شركتى باير الألمانية وهوكست على احقية أى منهما فى براءة اختراع أحد منظمات النمو الحشرية المعروف بالديميلين وقضت المحاكم بأحقية شركة هوكست بسبب أسبقيتها فى التقدم بملفات الحصول على البراءات .

القانون الأمريكى أكثر كرما من القانون الأوربى حيث يعتبر اليوم أو التاريخ الفعلى للكشف هو الذى يحدد تاريخ الأسبقية . يمكن الحصول على هذا التاريخ من سجلات المعامل كما يمكن لطالب البراءة أن يقدم الملف كاملا ومستوفى البيانات خلال سنة من تاريخ أول نشر للاختراع .

المكاسب المادية من براءات الاختراعات

بمجرد الحصول على براءة الاختراع تبدأ الخطوة التالية لاستثمار جزئى فى التكنولوجيا الحيوية وتكاليف الحماية . يمكن تحقيق هذا التوجه بطرق متعددة ولكن أكثرها شيوعا يكون من خلال الترخيص بالموافقات Licensing agreement . هذه التصاريح قد تكون وحيدة أى لجهة واحدة فقط أو غير وحيدة . لقد بدأ هذا الاتجاه منذ عام ١٩٩٠ . مثال ذلك أن شركة Bio-Rad حصلت على ترخيص وحيد لتصنيع اقتراب مدفع الجين gene gun الذى اكتشف وطور بواسطة شركة DuPont كذلك قامت شركة Asgrow Seed بشراء حقوق غير وحيدة الى شركة Mogen الدولية لبحوث المقاومة للفطريات فى المحاصيل البستانية . هاتين الشركتين سوف يعملان معا للحصول على أصناف نباتية مقاومة للفطريات على أن تتلقى شركة موجين فوائد وعائدات من شركة Asgrow على مبيعات الأصناف المحسنة . فى ألمانيا إحدى شركات المدعومة من هوكست والتى تقع فى باريس (روسيل أوكلاف) دخلت فى مجال البحث والتطوير والتسويق من خلال الاتفاقيات بمقدار ٣ مليون دولار أمريكى خاصة للمبيدات الحشرية البكتيرية من شركة إيكوجين (Langhorne , PA) . هناك أمثلة عديدة فى هذا المجال .

التصاريح الإجبارية Compulsory License

إذا كان صاحب براءة الاختراع لا يسمح باستخدام الاختراع بواسطة شخص أو شركة أو جهة أخرى مع أن الشخص أو الجهة تقدم استعدادها لدفع تعويض مناسب ومجزى مع التأكيد على حفظ الجوانب السرية فان هذا الشخص أو الهيئة يمكن أن تحصل على تصريح إجبارى إذا كان الأذن ضرورى وحيوى للعامة .

فرص التكنولوجيا الحيوية فى حماية المزروعات

فى حماية المزروعات شاركت مجموعة عارضة من التكنولوجيات فى نطاق التكنولوجيا الحيوية . سوف نحاول فى هذا المقام تناول إسهامات هذه التكنولوجيا فى وقاية النباتات .

الجينات المانحة البكتيرية Bacterial donor genes

تحتوى المراجع على العديد من الإصدارات الخاصة باستخدام بكتريا باسيلليس ثورينجينسيز كوسيلة طبيعية لمكافحة الآفات . كذلك يوجد الكثير عن النواحى العلمية والتقنية وبراءات الاختراع عن هذه المستحضرات الحيوية . البللورات التى تنتج بواسطة الكائنات الدقيقة سامة لبعض الحشرات . لقد أثار هذا الكشف اهتمام الشركات التى تتطلع لاستخدامها كوسيلة مكافحة حيوية . المستحضر الأول الذى سوق على نطاق تجارى من البكتريا Bt كان عام ١٩٥٧ تحت الاسم التجارى Thuriade بواسطة شركة ساندوز (Peferoen ، ١٩٩٢) . من بين آلاف السلالات الطبيعية تم عزل بعضها وأخذت براءات الاختراع . لقد تم مضاعفة وتعديل هذه السلالات حتى تجمع صفات الإبادة على الحشرات للسلالات المنفصلة المستقلة مما يزيد من النشاط بشكل واسع . نقل الجينات المعنية التى تشترك فى إنتاج التوكسين أخذت هى الأخرى براءة اختراع خاص بها تعنى وصف التحول الوراثى للطماطم والبطاطس والقطن لتحقيق المقاومة ضد حشرات حرشفية وغمدية الأجنحة .

الجينات المانحة النباتية

عزل الجين من نبات وإدخاله فى نبات آخر لتحقيق الحماية ضد الآفات من المجالات الأخرى فى وقاية المزروعات التى نتجت من اقتراب التكنولوجيا الحيوية . الشركة الزراعية للوراثة قامت بعزل والحصول على براءة اختراع للجين المسئول عن إنتاج مثبط التربسين فى اللوبيا . مثبط التربسين الناتج يمنع الحشرات الغازية من هضم البروتين ومن ثم تموت من الجوع . لقد تم نقل الجين الى أجناس نباتية أخرى من خلال

الهندسة الوراثية وطرق التحويل . حماية القطن ضد ديدان اللوز تعتبر أحد الأهـداف فـي استغلال هذه التكنولوجيا . إن مميزات استخدام النباتات المتحولة في مكافحـة الحشـرات تشمل الحماية طويلة المدى بعيدا وباستقلالية عن تأثيرات المناخ كما أنها تكون مقيدة علـى الآفات التي تأكل النبات المستهدف وليس الأعداء الطبيعية .

التقنيات الحيوية Biotechniques

لقد تم تطوير عدد من طرق التحول الوراثي في البيئة تجاريا . لقد بدأ ذلك باكتشاف بكتريا التربة أجروباكتيريوم توميفيسيتس والتي استخدمت بكفاءة في نقل الجينات الغريبـة في العديد من النباتات الأخرى ثم تحركت الى طرق النقل المباشر للدنا DNA مثل التثقيب الكهربي (Froman وآخرون ، ١٩٨٥) والتحول الذي يوجد في وسط البولـي إيثيليـن جليكول (PEG) (Krens وآخـرون ، ١٩٨٢) الحقـن الدقيـق فـي البروتوبلاسـت (Spangenberg وآخرون ، ١٩٩١) وكل هذا أضيف الى عدد براءات الاختراعات فـي مجال التكنولوجيا الحيوية . لقد حصلت شركة Agracetus علي براءة اخـتراع أمريكيـة تغطي طريقة تحفيز الجسيم لإدخال الجينات في فول الصويـا . لقـد أدى اسـتخدام هـذه الطريقة الى هندسة أصناف القطن الأمريكية . لقد قاموا كذلـك بهندسـة أصنـاف الأرز المقاومة لمبيدات الحشائش وأظهرت نقل ثابت للأجيال التالية . من أكثر هذه الطرق أهميـة نظام الناقل المزدوج لشركة Mogen والذي حصل على براءة الاختراع عام ١٩٩٠ وقـد استخدم على نطاق واسع في تحويل النباتات عريضة الأوراق . هذه البراءة حصلت علـى موافقة مكتب البراءات الأوربي عام ١٩٩١ كما أنها قدمت لنفس الفرصة في اليابان .

لقد تقدمت شركتي ICI , Calgene للحصول علـى بـراءات اخـتراع تغطـي تكنولوجيا التعطيل antisense وقد كانت الاتجاهات متماثلة تغطي تشفير الجين أو تغطيـة الجين الذي يشفر انزيم النضج في الطماطم بولي جلاكتو رونيز وكذلك اسـتخداماته فـي صورة تعطيل لتبطيء تطرية جدار خلية الطماطم .

التشخيص diagnostics

لقد قدمت ملفات للحصول على براءات الاختراع في مجال تشـخيص الأمـراض النباتية . لقد شملت هذه اختبارات تحليل المناعة للكشف عـن فـيروس نيكـروز البنجـر الأصفر والذي يسبب مرض ريزومانيا وكذلك الكشف عن بكتريا العفن الأسود في الطماطم كما امتدت مظلة بحوث التشخيص لتشمل طرق التكبير للكشف عن البكتريا في البيئة .

عمل خرائط للجينوم **Genome mapping**

لقد تم تصميم برنامج عالمى لعمل خريطة للجينوم الصغير لنبـــات أرابيدوبســيس ثاليانا للحصول على معلومات حول موضع وتنظيم الجين فى هذه الحشيشة البسيطة . هناك آمال أن هذا البرنامج يؤدى الى التعريف السريع واستخدام وتعديل الجينات المقابلـــة فــى المحاصيل التجارية . عمل خرائط للجينوم فى أنواع المحاصيل الكـــبرى ســوف تعطــى معلومات حول موضع معظم الجينات الهامة والإسهام فى التربية النباتية لتحقيق الحصـــول على أصناف نباتية مقاومة للأمراض والآفات .

التكنولوجيا الحيوية ووقاية المزروعات

لقد استخدم مدى واسع من الطرق والجينات فى وقاية النباتات . لقد قـــامت شــركة Biosys (CA , USA) بإستخدام النيماتودا فى مكافحة الحشرات بينما قام الصينيـــون بإدخال البلازميد المحتوى على بكتريا B.t. المحورة مع جينات الاندوتوكسن فـــى نباتـــات الدخان للحصول على نباتات ذات سمية زائدة ضد يرقات حشرات براعم الدخـــان . عـــدد المحاصيل المختلفة فى التجارب الحقلية لتحقيق صفات وراثية خاصة فى الجـدول (١٤-٢)

جدول (١٤-٢) : عدد المحاصيل المختلفة المشتركة فى التجارب الحقلية لتحقيق صفـــات وراثية معينة عام ١٩٩١ .

نوع الجين المستهدف إدخاله	عدد المحاصيل التى استخدمت
مقاوم للفيروس	٥
مقاوم للأمراض النباتية	٤
مقاوم للحشرات	٥
مقاوم لمبيد الحشائش	٨
تحسين جودة المنتج	٦
المجموع	**٢٨**

النواحى الأخلاقية **Ethical issues**

الاستخدام الناجح للتقدم الحديث فى مخرجات التكنولوجيا الحيويـــة فـــى النباتـــات لتحقيق فوائد للإنسان نتطلب تشريعات متوازنة وعقلانية . هذا يتوقف على مـــدى إحاطـــة

العامة علما وبصدق لكل جوانب هذه التكنولوجيا سواء كانت إيجابية أو سلبية والأخيرة أولا. معظم الناس يعتقدون في فوائد هذه التكنولوجيا ولكن هناك مخاوف من أن تؤدى الى إنتاج أحياء تمثل خطورة أو تنتج آفات أكثر خطورة من جراء التزاوج مع آفات أخرى فى البيئة . الرأى العام يمثل عقبات وتحديات كبيرة أمام نشر مخرجات التكنولوجيا الحيوية فى الدول الأوربية حيث يركزون على النواحى الأخلاقية والاقتصادية والسياسية والثقافية لهذه المواد المحورة وراثيا . لقد أدت هذه الضغوط الى تقييد الاتجار فى هذه المواد المحورة حيث فقد الألمان على سبيل المثال جزءا كبيرا من استثماراتهم فى البحث عن مخرجات تكنولوجية حيوية بسبب هذه القيود . كذلك قام المعارضون في هولندا بتحطيم المعمل والصوب والنباتات المهندسة وراثيا مما أدى الى خسارة ملايين من الجنيهات . العكس تماما يحدث فى أمريكا حيث تشجع الهيئات دون معارضة قوية من الخصوم أو إتلاف للبنية الأساسية لهذه التكنولوجيا الاستمرار فى الحصول على مواد مهندسة وراثيا خلافا لما يحدث فى أوربا .

النواحى المالية Financial aspects

فى عام ١٩٨٠ حققت بعض الشركات فوائد من التكنولوجيا الحيوية . بالرغم من تحقيق نجاحات كبيرة فى كلونة الجينات وتحويل وخلق النباتات المتحولة وراثيا لم تحقق نجاحات على المستوى التجارى خاصة فى مجال الحصول على تقاوى من الأصناف المحصولية ذات الصفات المرغوبة . من النقاط المقيدة لسرعة العمل فى هذه التكنولوجيا فى الشركات تكاليف الحصول على براءات الاختراعات والتشريعات ومدى قبول الطرق المستخدمة والمنتجات المتحصل عليها وكلها عقبات فى وجه صناعة التكنولوجيا الحيوية . المشكلة أن هذه الشركات ليست عندها تأكيد باسترداد استثماراتها وتحقيق عائدات مجزية . لذلك فان الشركات القادرة على الدخول فى هذا المجال قليلة للغاية بسبب طول المدة التى يستغرقها العمل المضنى للحصول على منتج واحد يحقق كل المواصفات المطلوبة ونفس الصعوبات مع التسجيل وإقناع العامة بقبول المنتجات المهندسة وراثيا . الجدول (١٤-٣) يوضح الاستثمارات التى وجهتها الشركات عام ١٩٩٠ فى مجال التكنولوجيا الحيوية النباتية (سوف أتركها بالإنجليزية لأنها مجرد أسماء شركات ودول) .

جدول (١٤-٣) : الاستثمارات فى البحوث الخاصة بالتكنولوجيا الحيوية النباتية وتطويرها عام ١٩٩٠ .

No.	Company	Location	US Sm
1	Du Pont	USA	20
2	ICI	UK	18
3	Momsanto	USA	18
4	Sandoz	Switzerland	17
5	CIBA-Geigy	Switzerland	15
6	DNA Plant Technology	USA	13
7	Calgene	USA	11
8	Sanofi	France	11
9	Mycogen	USA	10
10	Bio Technica International	USA	8
11	Novo Biokontrol	Denmark	8
12	Baryer	Germany	8
13	Plant Genetic Systems	Belgium	8
14	AGC	UK	7
15	Agracetus	USA	6
16	Abbott	USA	6
17	Ecogen	USA	6
18	BASF	Germany	5
19	Salvay	Belgium	5
20	Calliope	France	5
21	Cuanamid	USA	4
22	Dow Elanco	USA	4
23	Hoechst	Germany	4
24	Upjohn	USA	4
25	Kemira OY	Finland	3

Source: Company Reports and Country Natwest Wood Mac

REFERENCES

Altman, A. (1991). Frontiers of biotechnology in agriculture. Trends in Biotechnology, 9: 373-4.

Anonymous (1991). Genetic engineering for resistance to fungal and bacterial disease. Impact AgBioIndustry. December 1991, 13-20.

Bevan, M.W. and Chilton, M.D. (1982). T-DNA of Agrobacterium Ti, and Ri plasmids. Annual Review of Genetics, 16, 357-84.

Chasseray, E. and Duesing, J. (1992). Field trials of transgenic plants: An overview. Agro-Food Industry Hi-Tech., July / August, 5-10.

Chataway, J. (1991). Biotechnology and Business blues. Ag Biotech News and Information, 3; 1003-5.

DeCleene, D. and Deley, J. (1976). The host range of crown gall. Botanical Review, 42, 389-466.

Formm, M.E., Taylor, L.P. and Walbot, V. (1985). Expression of genes electroported into monocot and dicot plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 82, 5824-8.

Garner, N., Van Den Elzen, P. and Cornelissen B.J.C. (1992). The potential for the control of fungal disease in crop plants using gene transfer technology. Biotechnology International, 111-6.

King, D. (1991). The ultimate claim, Chemistry and Industry, June, 404.

Krens, F.A., Molendijk, L., Wullems, G.J. and Schilperoort R.A. (1982). In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. Nature, 296, 72-4.

Peferoen, M. (1992). Bacillus thuringiensis in crop protection Agro-food Industry Hi-Tech, November / December, 5-9.

Rigby, S. (1991). B.t., in crop protection, in Agrow, (ed. J. Sackett), P.J.B. Publications, Richmond, Surrey, UK.

Roberts, T. (1993). Intellectual property for biotechnology, in Opportuni-ties for Molecular Biology in Crop Protection (eds D.J. Beadle, D.H.L. Bishop, L.G. Copping G.K. Dixon and D.W. Hollomon) BCPC Monograph 55 British Crop Protection Council Farnham, UK, pp. 305-19.

Spangenberg, G. Neuhaus, G. and Potrykus, I. (1990). Micromanipulat-ion in higher plant cells, in Plant Cell Live Selection: procedures and Applications, (ed. P.J. Dix), VCH, Weinheim.

Van Dullen, S. (ed) (1992). Introduction of Patents Information, 2nd edn, The British Library, London.

Van Montague, M. (1991). New plants. future in agriculture Agro-Industry Hi-Tech, January / February, 8-15.

Watts, S. (1991). A matter of life and patents. New Scientist, 129, 56-61.

المصطلحات

A

Antisense technolegy	تكنولوجيا تعطيل الجينات
Antibiotics	مضادات حيوية
Amino acids	أحماض أمينية
Anticodon	الكودون المضاد
Atuosomes	الأوتوزومات
AIDS	الايدز
Antibodies	أجسام مضادة
Adrenol	الغدة الكظرية
Antigens	الأنتيجينات
Attenuated	مستضعفة
Auxin	الأوكسين
Avian influenza	انفلونزا الطيور
Artificial insemination	التلقيح الاصطناعى

B

Biotechnology	البيوتكنولوجيا الحديثة
Biological systems	النظم البيولوجية
Biomining	التعدين البيولوجى
Bieremedation	التنظيف البيولوجى
Banding	التشريط
Bacterium	البكترة
Blunt ends	أطراف جافة
Beta galactocidase	بيتا جالاكتو سيديز
Blue green algae	الطحالب الخضراء المزرقة
Bioreactors	مفاعلات حية
Breeding value	القيمة التربوية
Biological diversity	التنوع الحيوى

C

Cell culture	زراعة الخلايا
Cell fussion	دمج الخلايا
Cleming	الاستنساخ
Chromosomes	الكروموسومات
Cytoplasm	السيتو بلازم
Chromatin	الكروماتين
Cell membrane	غشاء الخلية
Cell wall	جدار الخلية
Chloroplastids	البلاستيدات الخضراء
Chlorephyll	الكلوروفيل
Collogen	الكولاجين
Cell specification	التخصص الخلوى
Centromere	سنترومير
Chromatids	الكروماتيرتين
Crossing over	العبور
Cloning	الكلونة
Crown gall	التدرن التاجى
Cosmide	الكوزميدات
Color blindness	عمى الألوان
Colony	مستعمرة
Cholestrol	الكولسترول
Carotid arteries	الشرايين السباقية
Caprine arthritis encephalitis (CAEV)	فيروس العنذ
Carnation	القرنفل
Chrysanthemum	الافحوانٍ
Callus	الكالص

D

Diagnostics	مواد تشخيصية

Double helix	اللولب المزدوج
Dynorphin	الدينورفين
Duchenne	مرض دوتشين
DNA polymerases	انزيمات بلمرة الدنا
Dicotyledons	ذوات الفلقتين
Deletion	اقتضاب
DNA segments	مقطعى دنا
Dwarfism	القزمية
Diabetes	مرض السكر
Donors	واهبين

E

Embryo maipulation	منابلة الأجنة
Embryo transfer	نقل الأجنة
Eukaryotes	حقيقيات النواه
Endoplasmic reticulum	الشبكة الاندوبلازمية
Enzymes	الانزيمات
Exons	إكسونات
Exponentially	يتضاعف تكرار أسيا
Electrophoresis	التفريد الكهربائى بالجيل
Electroporation	الثقب الكهربائى
Extended family	عائلة ممتدة

F

Follicular lymphoma	الليمفوما الحويصلية
Freeze dried	جفف بالتجميد
Fixed	مثبت
Feed efficiency	كفاءة التحويل الغذائى

G

Gene transfer	نقل الجينات
Genetic fingerprint	البصمة الوراثية
Genetic engineering	الهندسة الوراثية

Gene therapy	العلاج بالجينات
Golgi bodies	أجسام جولجى
Gamete	جاميطة
Glycoprotein	الجليكوبروتين
Gonetypes	تراكيب وراثية
Gammainterpheron	جاما إنترفيرون
Giantism	العملقة
Gerbera	الجيربيرا
Galactose	سكر الجالاكتوز

H

Human genome	الجينوم البشرى
Histones	هستونات
Hormones	الهرمونات
Heomoglobin	الهيموجلوبين
Homologues	سلسلة متجانسة
Homozygote	متجانس
Heterozygote	خليط
Hypotholamus	غدة الليبوثالامص
Hemophiliocs	مرض النزف الدموى

I

Interferon	الانتروفيرون
Introns	إنترونات
Insert	مولجة
Immunoglobulins	جلوبيولينات المناعة
Inhibitor	مثبط
In situ hybridization	التهجين فى الموقع
Immortol	خالدة
Intercellulor fluid	سوائل ما بين الأنسجة
Identical twin	توأمة الطبيق
Introlerants	الحساسين

K

Killer cells	الخلايا القاتلة

L

Law of independent assortment	قانون التوزيع الحر أو المستقل
Linkage groups	مجاميع ارتباطه
Linkage maps	خرائط الارتباط
Leukemia	اللوكيميا
Langerhans	لانجرهانس
Licorice	العرقسوس
Lactose	اللاكتوز
Lactase	انزيم اللاكتيز

M

Monoclonal antibodies	الأجسام المضادة النقية
Molecular biology	البيولوجيا الجزيئية
Messenger RNA	الرنا المرسال
Mitochondria	الميتوكوندريا
Macromolecules	جزيئات عملاقة
Mitosis	الانقسام الميتوزى
Meiosis	الانقسام الميوزى
Microingection	الحقن الدقيق
Markers	واسمات
Muscular dystrophy	الخلل العضلي
Mutation	طفرة
Metabolism	الأيض

N

Nuclear pores	الثقوب النووية
Nucleus	النواة
Nucleulus	النوية

Nucletide	النواتيرة أو النوتيدة
Nuclear RNA	الرنا النووى
Nitrogenase	النتروجينيز
Nodules	العقد الجذرية

O

Oncogenes	جينات السرطنة

P

Prokaryotes	بدائيات النواة
Photosynthesis	التمثل الضوئى
Peptide bends	الروابط الببتيدية
Protein synthesis	تمثيل البروتين
Promoters	المنشطات
Point mutations	الطفرة النقطية
Plasmids relaxed	البلازميدات الرخوة
Plasmids	بلازميدات
Protein coat	غلاف بروتين
Phages	الفاجات
Protoplasts	بروتوبلاستات
Particle gun	مسدس جسيمات
Phenotype	مظهر الأفراد
Pathogen	ممرض
Pituitary	الغدة النخامية
Preproinsulin	ممهد الانسولين
Petunia	البيتونيا
Potato blight	اللفحة فى البطاطس
Pompe disease	مرض بومب

R

Recombinant DNA	الدنا المطعم
Ribosomes	الريبوسومات
Receptors	المستقبلات

Ribonucleic acid (RNA)	الحمض النووى الريبوزى (رنا)
Retroviruses	الفيروسات الارتجاعية
RNA polymerases	انزيمات بلمرة الرنا
Ribosomal RNA	الرنا الريبوزومى
Reverse transcription	النسخ العكسى
Restriction enzymes	إنزيمات التحديد
Recognition sequence	تتابع معين
Recombinant DNA	الدنا المطعوم
Recognition sequences	مواقع التعرف
Restriction fragment length	تباينات طول شظايا التحديد أو الرفليبات
Polymorphisms	تأشيب
Recombination	الدمج
Rhizopium	الريزوبيوم
Resin	الراتنج

S

Split genes	الجينات المغروقة
Splicing	عملية التشذين
Sticky ends	أطراف لزجة
Sickle cell anemia	انيميا الخلايا المنجلية
Stroke	السكتة الدماغية
Smallpox	الجدرى
Sweetener	محلى
Synthesized	مصنع

T

Tissue culture	زراعة الأنسجة
Transcription	عملية النسخ
Transfer RNA	الرنا الناقل
Template	قالب
Telomer	تيلومير
Tonsils	حجم اللوزتين

Toumatin family	عائلة التوماتين
Transgenic	عبر الجين

V

Vaccins	فاكسينات
Vectors	ناقلات
Variable number of tandem repeats (VNTRs)	المكررات الترادفية المتباينة للعدد
Very low density lipoprotein	الليبوبروتين منخفض الكثافة جدا
Variation Somoclonal	التباين الخضرى الكلونى

W

Water fern	سرخس مائى

Y

Yeast artificial chromosoms (YACs)	كروموزومات الخميرة الاصطناعيـــة "اليكان"

الفهرس

رقم الإيـــداع
٢٠٠١/١٧٧٠٦



أ.د. زيدان هندى عبد الحميد

* بكالوريوس العلوم الزراعية "حشرات" كلية الزراعة جامعة عين شمس ١٩٦٣ .
* ماجستير العلوم الزراعية "كيمياء مبيدات" كلية الزراعة جامعة عين شمس ١٩٦٦ .
* دكتوراه فلسفة العلوم الزراعية "مبيدات الآفات" كلية الزراعة جامعة عين شمس ١٩٦٩ .
* مدرس فى علوم وقاية النبات ١٩٦٩ - ١٩٧٤ بكلية الزراعة جامعة عين شمس .
* أستاذ مساعد فى علوم وقاية النبات ١٩٧٤ - ١٩٧٩ بكلية زراعة جامعة عين شمس .
* أستاذ فى علوم وقاية النبات ١٩٧٩ وحتى الآن بكلية الزراعة جامعة عين شمس .
* وكيل كلية الزراعة جامعة عين شمس لشئون الدراسات العليا ١٩٩٢ - ١٩٩٨ .
* مستشار علمى لشركة سوميتومو كيميكل اليابانية للمبيدات منذ ١٩٧٨ وحتى الآن فى مصر والدول العربية .
* المشاركة فى معظم المؤتمرات المحلية والعالمية فى مجالات وقاية النبات - كيمياء المبيدات - المكافحة المتكاملة للآفات - المشاكل الخاصة بالتلوث البيئى .
* المشاركة فى العديد من الدورات الخاصة بالتوعية بمخاطر المبيدات والملوثات البيئية الأخرى فى مصر والدول العربية الأخرى .
* الأشتراك فى المشروعات القومية الخاصة بالمكافحة المستنيرة للآفات والتلوث البيئى والمكافحة الحيوية للآفات .
* عضو فى العديد من الجمعيات العلمية فى مجالات وقاية النبات والبيولوجية الجزيئية وكيمياء المبيدات والتوكسيكولوجى والمبيدات والتلوث البيئى .

* بعض مما نشر لـ أ.د. زيدان هندى

١) الاتجاهات الحديثة المبيدات ومكافحة الحشرات ٢ ج . ١٩٩٥

٢) الآفات الحشرية والحيوانية . ١٩٩٥

٣) الملوثات الكيميائية والبيئية . ١٩٩٦

٤) التسمم الغذائى والملوثات الكيماوية . ١٩٩٩

٥) أساسيات وطرق تحليل مبيدات الآفات . ١٩٩٩

٦) انقلاب الجنس وفقد المناعة بين المبيدات والهرمونات . ١٩٩٩

٧) السمية البيئية والتفاعلات الحيوية للكيميائيات والمبيدات . ٢٠٠٠

٨) المكافحة المستنيرة للأمراض النباتية .

٩) فساد الأرض وتدمير الإنسان .

١٠) هموم الإنسان والبيئة .

١١) الأمراض الفطرية ومكافحة الأمراض النباتية .

١٢) الموارد المائية والاتساخ بالمبيدات .

١٣) ترشيد المبيدات فى مكافحة الآفات .

١٤) التكنولوجيا الحيوية والجزيئية فى مجابهة الآفات الزراعية والاجهادات البيئية .

١٥) مخاطر المبيدات على الصحة العامة والبيئة .

١٦) السموم النباتية ومكافحة الآفات . ٢٠٠٢